

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

Aplicación de fosfatos de calcio y fibronectina como tratamiento complementario en fracturas sobre hueso osteoporótico

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Javier Quintana Plaza

Directores

Carlos Resines Erasum
Luis Rodríguez Lorenzo

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Cirugía



TESIS DOCTORAL

APLICACIÓN DE FOSFATOS DE CALCIO Y FIBRONECTINA COMO TRATAMIENTO COMPLEMENTARIO EN FRACTURAS SOBRE HUESO OSTEOPORÓTICO.

Javier Quintana Plaza

Bajo la dirección de:

Profesor Carlos Resines Erasun

Doctor Luis Rodríguez Lorenzo

Madrid, 2013

A mis padres, mis hermanas, mi familia

Agradecimientos

En primer lugar, me gustaría darles las gracias a mis directores de tesis. Al Doctor Resines por su infinita paciencia para aguantar a un “pelma” como yo y al Doctor Rodríguez Lorenzo, por guiarme y ayudarme en este largo camino. Y sobre todo por permitirme disfrutar de esta experiencia.

A Montse y Mar sin las cuales todo el estudio en los conejos hubiese sido imposible, por tener siempre tan buena disposición y buen humor. Y a Julio César, sin tu ayuda todavía estaría operando conejos.

A los compañeros de Zaragoza que han hecho el análisis de imagen. Principalmente a Carlos por su magnífico trabajo y por tener una paciencia infinita.

Por supuesto a Lorena, porque sin ella y su análisis histológico hoy no podría presentar esta tesis.

A Eva por realizar un gran trabajo, repetir mil veces los distintos análisis estadísticos, y soportar mis múltiples visitas a última hora.

A mis padres por ser dos personas maravillosas, que me han enseñado que con esfuerzo todo es posible. Nunca podré agradecerlos todo lo que hacéis por mí.

A mis hermanas y mis sobrinos, gracias por tolerar mis ausencias, espero poder dedicaros más tiempo a partir de ahora.

A Bea, por darme ánimos, y aportarme mil ideas siempre con una sonrisa. Gracias

Abreviaturas

- Ag: Antígeno
- ALP: Fosfatasa Alcalina.
- AO: Asociación de osteosíntesis.
- ATP: Adenosin trifosfato.
- BMD: Densidad mineral ósea.
- BMP: Proteína morfogenética ósea.
- BMU: Unidad básica multicelular.
- BVF: Volumen de hueso en el volumen total.
- Ca²⁺: Calcio.
- CD: Cúmulo de diferenciación. Marcador linfocítico.
- CMM: Célula madre mesenquimal.
- CSF-M: Factor estimulador de macrófagos.
- DHS: Tornillo dinámico de cadera
- DMB: Matriz ósea desmineralizada.
- DMP-1: Proteína de la matriz dentaria 1.
- H⁺: Hidrógeno
- HA: Hidroxiapatita.
- HLA: Complejo mayor de histocompatibilidad.
- IGF-1: Factor de crecimiento tipo insulina

- IL: Interleuquina
- KOH: Hidróxido de Potasio.
- LCP: Placa hibrida. Bloqueada/compresión.
- LISS: Sistema de estabilización poco invasivo.
- Mg²⁺: Magnesio
- Micro-CT: Micro scanner.
- MOH: Médula ósea hematopoyética.
- OMS: Organización mundial de la salud.
- OHAp: Muestras con hidroxiapatita
- OHAp-Fn: Muestras con hidroxiapatita más fibronectina.
- OPG: Osteoprotegerina.
- P⁺: Fosfato.
- PBS: Solución tampón de fosfato.
- PDGF: Factor de crecimiento derivado de las plaquetas.
- Ph: Potencial de hidrógeno.
- PMMA: Polimetilmetacrilato.
- PRP: Plasma rico en plaquetas.
- PTH: Hormona paratiroidea.
- PVC: Policloruro de vinilo.
- RANK: Receptor activador del factor nuclear κ B.
- RANK L: Ligando de RANK.
- RGD: Secuencia Arg-Gly- Asp.

- RM: Resonancia Magnética.
- RUNX-2: Factor de transcripción para la diferenciación osteoblastos.
- Rx: Radiografía.
- SIBLINGS: *Small integrin binding N linked glycoprotein*.
- SSA: Estructura de la superficie del material.
- TAC: Tomografía axial computerizada.
- TbTh: Grosor trabecular.
- TbSp: Separación trabecular.
- TCP: Fosfato tricálcico.
- TGF β : Factor de crecimiento transformante tipo β .
- TNF: Factor de necrosis tumoral.
- VEGF: Factor de crecimiento vascular.

Índice

1. Resumen	11
1.1 Resumen español	11
1.2 Resumen inglés	25
2. Introducción	39
2.1 Biología ósea	39
2.1.1 Introducción	39
2.1.2 Composición	39
2.2 Fractura osteoporótica	43
2.2.1 Características del hueso osteoporótico	43
2.2.2 Consolidación en hueso osteoporótico	45
2.2.3 Osteosíntesis en osteoporosis	48
2.2.3.1 Problemas de fijación	48
2.2.3.2 Fractura fémur proximal	53
2.2.3.3 Fractura vertebral	56
2.2.3.4 Fractura húmero proximal	61
2.2.3.5 Fractura radio distal	66
2.3 Biomateriales	70
2.3.1 Biomateriales de origen sintético	70
3. Elección del tema y objetivos	73
4. Material y método	79
4.1 Síntesis del material	79

4.2 Elección del animal	86
4.3 Protocolo de osteoporosis	88
4.4 Instalaciones	90
4.5 Anestesia	95
4.6 Protocolo quirúrgico	97
4.7 Grupos experimentales	102
4.8 Análisis micro – CT	104
4.9 Protocolo histológico	108
5. Resultados	111
5.1 Resultados micro – CT	111
5.1.1 Análisis independiente del tiempo	117
5.1.2 Análisis dependiente del tiempo	120
5.1.3 Análisis detallado de las muestras	123
5.2 Resultados histología	144
5.2.1 Grupo control	144
5.2.2 Grupo OHAp	147
5.2.3 Grupo OHAp-Fn	150
6. Discusión	153
7. Conclusiones	191
8. Bibliografía	193
9. Anexo de resultados	215

1. Resumen

1.1 Resumen (español)

El envejecimiento progresivo de la población ha generado un incremento en la incidencia de las fracturas osteoporóticas. En un hueso de buena calidad, los métodos habituales de fijación son suficientes, sin embargo en un hueso osteoporótico no sucede lo mismo. Con el fin de reducir el número de complicaciones asociadas a este tipo de fracturas, se han diseñado nuevos tipos de implantes, como la placa bloqueada. A pesar de ello, los retardos de consolidación y otras complicaciones son comunes, con fallos de los tornillos de hasta el 25%. Otra posible solución es incrementar el agarre del tornillo al hueso a través de técnicas de aumento.

Las técnicas de aumento en la fijación de fracturas no es algo nuevo, Mueller en 1962, comenzó a usar PMMA en la fijación de fracturas. Pero el PMMA es un material con una baja biocompatibilidad, no es reabsorbible y además sufre una reacción de polimerización exotérmica, por lo que no es una solución muy adecuada para las fracturas osteoporóticas (Enis et al., 1974; Leeson and Lippitt, 1993). Cementos como el CPC, con características osteoconductoras, comenzaron a ser más populares y terminaron por reemplazar al PMMA (Larsson 2006; Yietal 2008). Sin embargo, sus propiedades biomecánicas inferiores al PMMA y el hecho de que sea un material exclusivamente osteoconductor, hizo que continuase la búsqueda de soluciones más adecuadas.

Hoy en día, la tendencia más popular es la utilización conjunta de biomateriales como los cementos combinados con materiales osteoinductores como los PRP o las BMP.

Aunque los estudios animales en vivo tienen buenos resultados, los resultados clínicos no son tan prometedores. Por tanto debemos seguir buscando soluciones a este problema.

Objetivo

En nuestro estudio, queremos probar la eficacia de nuestro material, Hidroxiapatita y Fibronectina como tratamiento complementario para las fracturas osteoporóticas.

Deseamos probar, que la combinación de estos dos componentes puede inducir, dirigir y promover la formación de hueso. Con ello mejorar la fijación al hueso y secundariamente reducir el tiempo de consolidación y finalmente reducir la morbilidad que causan estas fracturas.

Material y método

3.1 Material.

Necesitamos algo más que un andamio pasivo, si lo que buscamos en la inducción de nuevo hueso.

El tripétido RGD es una secuencia proteica presente en algunas proteínas conocidas como SIBLINGS (osteopontina, sialoproteínas óseas, fibronectina, vitronectina y tromboposdina) y que es reconocida por las integrinas de osteoblastos y osteoclastos. Esta secuencia actúa además como receptor para la adhesión de otros tipos celulares que influyen y desencadenan distintos tipos de procesos de formación ósea.

Por tanto, nuestra estrategia, es incrementar la bioactividad de nuestro material modificando su superficie, para permitir la unión a una proteína que contenga el dominio RGD.

Las razones por las que elegimos estos materiales fueron:

- Biocompatibilidad
- La no toxicidad de sus productos de degradación
- Coste
- Aplicabilidad
- Compatibilidad con el material de osteosíntesis

La Hidroxiapatita fue preparada a través de una reacción húmeda:



Fig 1. Reacción química y aparatos utilizados en la síntesis de la HA

La muestra utilizada (OHAp) fue la que mostró una mayor adsorción de Fibrinógeno, y que presentaba una conformación end-on. La respuesta esperada cuando el material entre en contacto con el tejido del receptor, debería ser la adsorción de grandes cantidades de proteína. En la conformación end-on el dominio proinflamatorio está

desactivado, pero el dominio RGD está libre, lo que promovería la adhesión de los osteoblastos.

La Fibronectina proviene de una fuente comercial.

3.2 Diseño experimental.

Para este estudio se eligió un modelo animal en conejos. Se optó por el conejo por su sistema Haversiano, semejante al hueso trabecular humano. EL conejo tiene una tasa de reposición ósea entre 2 y 3 veces superior a la del ser humano. Este hecho permite analizar mejor cambio a corto plazo. Aunque el modelo osteoporótico en rata es más conocido, su pequeño tamaño hace que la cirugía sea más compleja, además el pequeño espacio existente entre trabéculas hace que no sea apta para testar los efectos de materiales inyectables. Aunque los animales de mayor tamaño, como perros y ovejas, han demostrado ser superiores a los animales de menor tamaño por su similitud al ser humano en cuanto a grosor y separación trabecular, su elevado coste y su estabulación limitan las posibilidades de utilizarlos en experimentación.

Para intentar conseguir un hueso lo más parecido al osteoporótico (micro estructura alterada y densidad mineral ósea reducida) nos decidimos por usar un protocolo de osteoporosis siguiendo la bibliografía existente.

Administramos corticoides 1,5mg/kg/día durante 4 semanas y luego 2 semanas más de reposo. Con este protocolo pudimos alcanzar una reducción en la densidad mineral ósea de hasta el 40%, de acuerdo a estudios previos.

3.3 Modelo experimental.

Cuarenta y dos conejos blancos gigantes de Nueva Zelanda se utilizaron para el estudio. La zona de implantación del tornillo y el cemento fue el cóndilo lateral del fémur de ambas patas traseras. En ambos fémures se implantó el tornillo, en uno de ellos con el material y en el otro sin él, que hacía de control.

La elección del fémur derecho o izquierdo como control o muestra se hizo de manera aleatoria.

Los conejos se premedicaron con una dosis intramuscular de Xylazina (25mg/kg) Ketamina (4mg/kg) y Atropina (1mg/kg).

La inducción se realice mediante inhalación, con Isoflurano 4%.Se administro una dosis preoperatoria única, trimethoprim / sulfamethoxazol.

Como se trataba de un procedimiento corto (menos de 30 minutos), el mantenimiento se realizó 2% Isoflurano administrado con máscara y oxígeno puro a 1l/minuto.

Los anestésicos inhalatorios se administraron a través de un circuito anestésico abierto.

El abordaje se realizó mediante Una incisión en la piel en el lado lateral del fémur distal. El plano muscular se separó mediante disección roma para tener acceso al fémur. El punto de entrada para la perforación se determinó utilizando como referencia el ligamento colateral lateral, unos 5 mm proximales a éste. La broca de 3,2 mm se colocó perpendicular a la superficie del hueso, con cuidado de no perforar la segunda cortical. El impacto térmico de la perforación se minimizó con abundante irrigación con suero salino.



Fig2. Brocado del fémur

En uno de los fémures elegido de manera aleatoria, se implantaba el tornillo y en el contralateral el material y posteriormente el tornillo. Después de la inserción del tornillo, se suturó el subcutáneo con hilo reabsorbible (Vycril 3.0) y piel con monofilamento no reabsorbible (Ethilon-3.0).

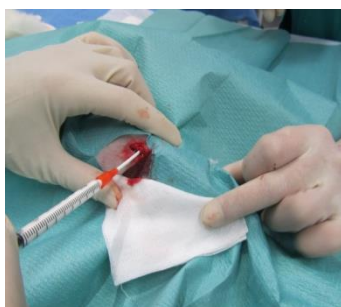


Fig3. Introducción del material

Los animales fueron sacrificados mediante una inyección intravenosa de Pentobarbital.

3.4 Análisis

Para determinar los efectos de nuestro biomaterial, los especímenes se sacrificaron a las 24 horas, las 48 horas y a los 5 días, para determinar el efecto durante las fases iniciales de la consolidación tras la fijación de la fractura.

Muestras fueron analizadas mediante:

- Técnicas de imagen (micro Ct): Para describir la morfometría del hueso trabecular analizamos BVF (cociente entre el volumen de hueso y el volumen total (%) mg/mm^3) and BMD (Densidad mineral ósea (mg/cc), grosor trabecular (mm), and separación trabecular (mm). El Micro- CT es eXplore Locus SP de GE Healthcare. Cada muestra se analizó a 80kV/90mA, con filtro de aluminio de 1 mm. El tamaño del pixel (resolución) fue de 0.017995 mm, la rotación fue de 360° con un ángulo de incremento de 0.5°, el tiempo de exposición fue de 1700 ms, y cada imagen se analizó de media 4 veces.
- Histología.

Las muestras se fijaron en una solución de formol al 10%. Después se deshidrataron mediante un proceso en el que se emplearon e disoluciones de graduación creciente de etanol. Tras la polimerización las muestras se seccionaron a través de su eje axial de manera longitudinal mediante una sierra de precisión. Los cortes creados se tiñeron con azul de Stevenel de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Resultados

4.1 Micro-CT resultados:

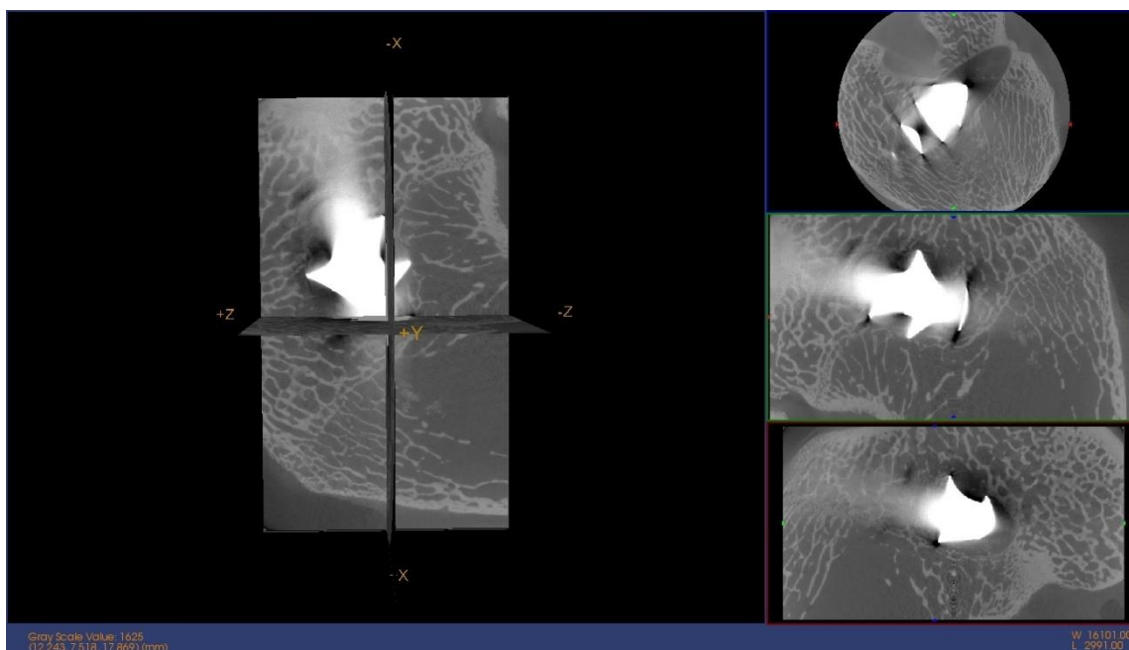
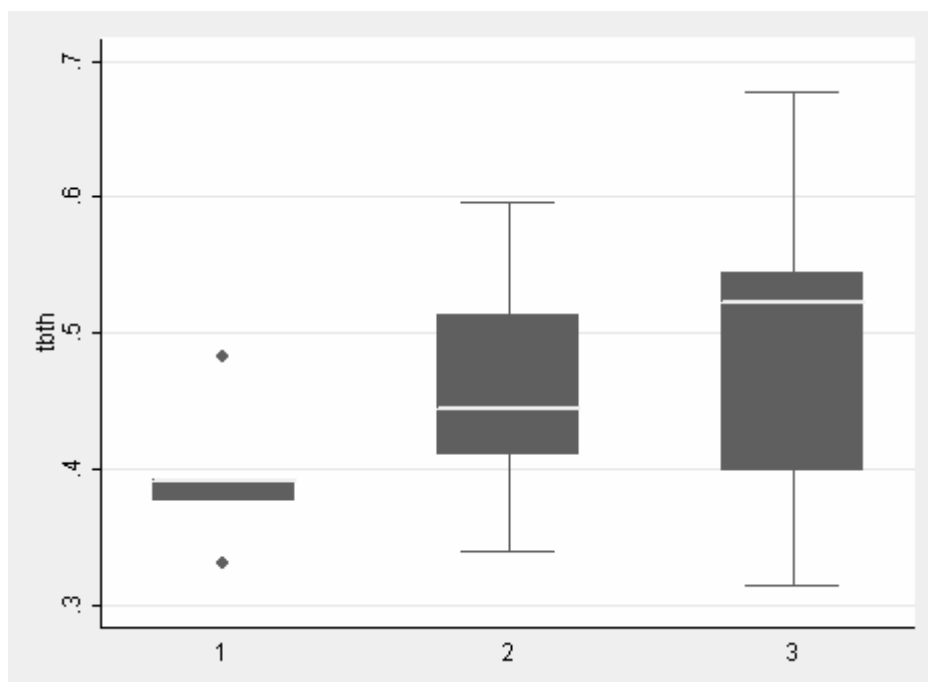


Fig. 4 Micro CT Imagen

El análisis independiente del tiempo, no mostró diferencias estadísticamente significativas para las variables BMD y BVF, aunque la mediana es ligeramente superior para la variable BMD en las muestras con proteína.

Sin embargo se observa una importante tendencia para las variables que definen la arquitectura trabecular, TbSp y TbTh. TbTh tiene una significación de $p = 0,1681$, que a pesar de no ser estadísticamente significativa ($p < 0.05$) debido al bajo número de especímenes analizados es un valor muy representativo. La otra variable, la separación trabecular, muestra una fuerte tendencia a decrecer, con los valores más bajos para las muestras con proteína.



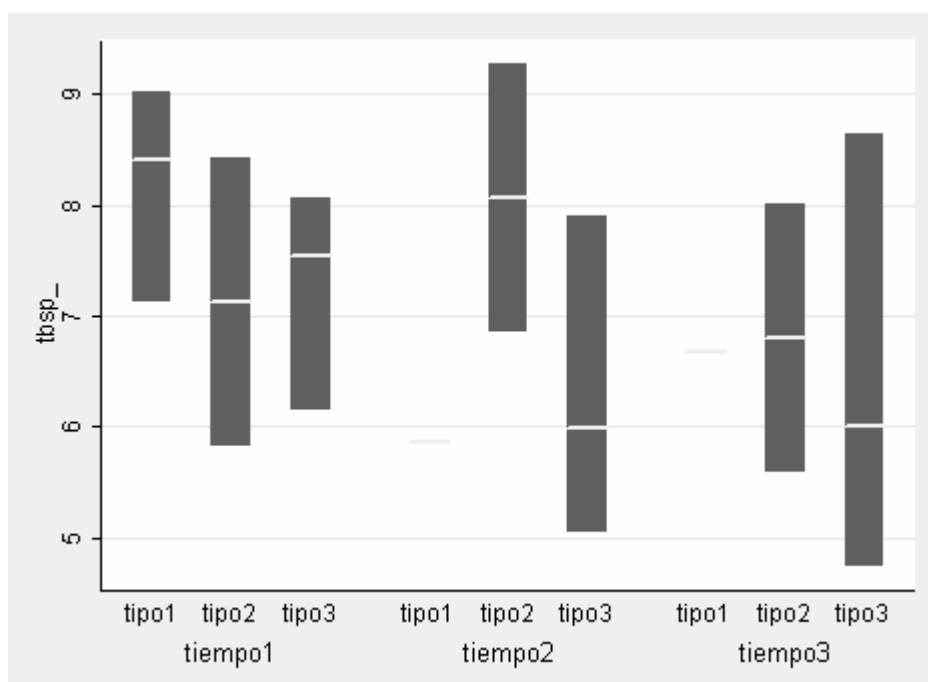
1.- Control

2.- OHAp

3.- OHAp-Fn

Fig. 5 TbTh Gráfico independiente del tiempo.

El análisis dependiente del tiempo no mostró diferencias significativas para ninguna de las variables. En las variables TbSp y TbTh (OHAp y OHAp-Fn) mostraron una tendencia negativa al 2 día para mejorar los resultados al 5 día.



1.- Control

2.- OHAp

3.- OHAp-Fn

Tiempo1- 24h

Tiempo2- 48h

Tiempo3- 5 días

Fig. 6 Gráfico TbSp tiempo dependiente

Análisis comparativo: Para determinar si el biomaterial incrementa la fijación al hueso, se realizaron comparaciones entre áreas cercanas al tornillo (derecha, izquierda e inferior) y una zona alejada a éste.

BVF y BMD no mostraron ninguna diferencia estadísticamente significativa entre las áreas cercanas al tornillo y las alejadas en ninguno de las tres muestras (Control, OHAp, OHAp-Fn).

En las variables que definen la micro arquitectura trabecular, observamos diferencias estadísticamente significativas, obteniendo en algunos casos una $p < 0,01$.

P=	Control (1)	OHAp (2)	OHAp-Fn (3)
Inferior-Alejado	0,0679	0,0431	0,0117
Dcha-Alejado	0,0679	0,0431	0,0117
Izqda-Alejado	0,0679	0,0431	0,0117

Fig.7 Tabla TbTh resultados

P=	Control (1)	OHAp (2)	OHAp-Fn (3)
Inferior-Alejado	0,0431	0,0277	0,0109
Dcho-Alejado	0,0431	0,0277	0,0077
Izdo-Alejado	0,0431	0,0277	0,0077

Fig.8. Tabla TbSp resultados.

4.2 Análisis Histológico.



Fig. 9 Muestra histológica. Tinción de azul de Stevenel.

El análisis histológico muestra una mayor celularidad con las muestras con proteína con respecto al resto, desde las primeras 24 horas. El número de células inflamatorias es bajo en todos los tipos de muestra. Aunque no podemos identificar el depósito de osteoide, sí que se observa una mayor cantidad de tejido conectivo en las muestras OHAp-Fn.



Fig. 10 Muestra OHAp-Fn (tejido conectivo asociado a la superficie del tornillo).

Discusión

La fractura osteoporótica es un problema creciente en nuestros días. La osteosíntesis supone un reto para el cirujano, por tratarse de un hueso con una densidad mineral y una arquitectura alterada. Los nuevos sistemas como la placa bloqueada intentan dar una solución a este tipo de fracturas, sin embargo las tasas de revisión y los fallos de la osteosíntesis son significativos.

Para reducir estas complicaciones debemos tener en cuenta que no es un hueso de características normales, y que debemos aportar algo complementario para conseguir una fijación estable.

Como métodos de aumento en el tratamiento de estas fracturas, encontramos los cementos como el PMMA o los de fosfato de calcio. Algunos como el PMMA con unas propiedades biomecánicas muy buenas, pero con una baja biocompatibilidad. Otros como los fosfatos de calcio, poseen propiedades osteoconductoras pero pobres propiedades mecánicas.

Para intentar mejorar las características del hueso y acelerar el proceso de consolidación, una de las estrategias más utilizadas en los últimos años es el uso de andamios (fosfatos de calcio, polímeros..) junto con osteoinductores como los PRP o las BMP. Los primeros han obtenido resultados prometedores en animales, no así en estudios clínicos. La posible causa de estas diferencias y los pobres resultados clínicos pueden ser debidos a la ausencia de criterios estandarizados, de la cantidad necesaria de PRP para cada caso. La cantidad de PRP obtenido por los métodos habituales probablemente aporte unas concentraciones demasiado bajas de factores de

crecimiento. Por otra parte los PRP ejercen su efecto en células vivas, es por ello que su uso combinado con materiales sintéticos no celulares, tenga unos resultados pobres frente a su uso junto a auto o aloinjerto.

Otra de las alternativas son las BMP. Consideradas como las proteínas con mayor poder osteoinductor. A pesar de los buenos resultados obtenidos en algunos modelos animales, es difícil reproducirlos en humanos. Existen distintas posibles razones para no encontrar un resultado positivo:

- ¿Dosis necesaria? En seres humanos utilizamos dosis suprafisiológicas, miligramos frente a nanogramos, lo que además puede presentar un peligro ya que se han documentado patologías por exceso de BMP
- Feedback: Otra explicación posible, es el hecho de que dosis excesivamente altas promuevan una activación de los inhibidores de las BMP (noggin o escierostina)
- ¿Tipo de BMP? No está muy claro, cuál de todos las BMP es la ideal. Es muy posible que el mayor efecto se consiga con una combinación de varias de ellas.

En nuestro caso nos decidimos por una estrategia alternativa, fosfato de calcio como soporte y Fibronectina como material osteoinductor.

En estudios previos observaban una mayor concentración de calcio en la matriz a la semana (estudios in vitro), por lo que nos decidimos por tiempos cortos (24 horas, 48 horas y 5 días).

Aunque en nuestro estudio no podemos afirmar que existe formación de hueso, si que objetivamos una mejora de los parámetros de la morfología del hueso trabecular en el grupo de muestras con proteína frente al resto. A su vez, en el análisis histológico de

las muestras se observa un incremento de la celularidad no inflamatoria en las muestras con proteína (OHAp-Fn) desde las primeras 24 horas.

A través de la Fibronectina y sus secuencias RGD podemos modelar el proceso de regeneración ósea y conseguir una consolidación más temprana, reduciendo el número de complicaciones que causan este tipo de fracturas.

La principal limitación de nuestro estudio es fundamentalmente el número de muestras analizadas. Además serán necesarios estudio a medio y largo plazo que demuestren los efectos de la Fibronectina y la comparen con otros métodos biológicos de aumento como las BMP.

1.2 Resumen (inglés)

Introduction.

The gradual aging of the population results in increased incidence of osteoporotic bone fractures. In a good quality bone, the fixation with the usual methods is enough, but not in osteoporotic bone. In order to reduce the number of complications, new implant designs have been developed, locked plates for example. However, consolidation delays and other complications are common, with failure rates for screws up to 25 %. Another concept would therefore be to improve the strength in the bone around the screw threads through an augmentation technique.

Augmenting bone in fracture fixation is not a new technique, Mueller in 1962, started to use PMMA for fracture fixation. But PMMA is a material that has poor biocompatibility, an exothermic polymerization, and its non-resorbability, makes it not a really popular solution for osteoporotic fractures (Enis et al., 1974; Leeson and Lippitt, 1993). Osteoconductive cements, such as CPC are becoming more popular in fracture fixation, replacing PMMA (Larsson 2006; Yietal 2008) .Nevertheless its mechanical properties are inferior to PMMA, and the fact that CPC is only an osteoconductive material, has resulted in the search for better solutions.

Nowadays, the most popular trend is to use osteoconductive materials as cements, combined with osteoinductive materials as PRP or BMP. Although in vivo studies are really promising, clinical studies with these materials are not as good as in vivo studies. Therefore we must give a solution to a problem that is increasingly important.

Objective

In our study, we want to test our material, Hydroxyapatite plus Fibronectine, as a complementary treatment for osteoporotic fractures.

We want to demonstrate that the combination of these materials can induce, direct and promote bone formation. Thereby improve fixation to bone, secondarily reduce consolidation time and thus reduce morbidity from fractures.

Materials and methods

3.1 Material.

We need more than a passive scaffold, if we want to induce the bone formation.

The arginine-glycine-aspartic acid (RGD) protein sequence is an integrin-binding, that is placed in some proteins known as SIBLINGS (Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein) comprising osteopontin, bone sialoproteins, fibronectin, and vitronectin tromboposdina. These proteins are involved in the process of remodelling and bone regeneration with RGD sequence recognized by integrins of osteoblasts and osteoclasts. Also act as surface receptors allowing cell adhesion to the matrix and the activating signals that influences downstream maturation events.

Therefore, our strategy is enhanced the bioactivity of materials by preconditioning their surface with a RGD containing protein.

We choose these materials for its features:

- Biocompatibility
- Non-toxicity of the degradation products
- Cost
- Applicability
- Compatibility with osteosynthesis material

Hydroxiapatite has been prepared by a wet chemical reaction:



Fig 1. Chemical reaction. Synthesis kit.

The sample is the one with the greater adsorption of fibrinogen, and also in all concentrations tested is adsorbed end-on conformation. The expected response if the material comes into contact with host tissue would be the adsorption of large amounts of protein. In this conformation the proinflammatory fibrinogen domain has disabled, but RGD domain it's free, which will promote osteogenic cell adhesion.

Fibronectin comes from a commercial source.

3.2 Experimental design

This study was performed in a rabbit in vivo model. We choose rabbit because its Haversian system is similar to human trabecular bone. Rabbit has a bone turnover between 2 and 3 times faster than human; this fact permits to analyze major changes in a short time. Although osteoporotic rat model is better known, their smaller size makes the surgery more difficult. Also the rat has a very small separation between trabeculae, which does not make it suitable for assessing the effects of injectable cements. Even large animals such as dogs and sheep have proved superior to smaller animals, because of its similarity in thickness and trabecular separation, have the problem of cost and housing.

In order to achieve characteristics of the animal bone, as similar to osteoporotic bone (altered microstructure and reduced bone mass) we decided to use a protocol of osteoporosis in rabbits following literature exists in this animal.

We administrate corticosteroids 1,5mg/kg/day for 4 weeks, and then 2 weeks of repose. With this protocol we can achieve a reduction of bone mass up to 40%, according to previous studies.

3.3 In vivo model.

Forty-two New Zealand White rabbits were used for the study. The in vivo evaluation was performed using steel cancellous bones crews (4 mm diameter and 10 mm longitude) that were implanted in the medial femoral condyle in both legs of the rabbits.

On one side augmentation with Hydroxiapatite or Hydroxiapatite plus Fibronectin was used around the screw while the contralateral control was non-augmented. Implantation site (left or right leg) for screw augmentation was randomized. The rabbits were premedicated with an intramuscular injection of Xylazine (25mg/kg) Ketamine (4mg/kg) and Atropine (1mg/kg).

The induction was performed by inhalation, with isoflurane 4%. Intra-operative single dosed preoperative antibiotic, trimethoprim / sulfamethoxazole were administrated.

It was a short procedure (under 30 minutes), so the maintenance was performed with 2% isoflurane managing mask and fresh gas (pure oxygen) to 1l/minute. Inhalation anesthetics were administered through an open anesthetic circuit.

A skin incision was made on the medial side of the distal femur. The muscles were separated using blunt dissection to access the femur. The entry point for drilling was localized using the insertion point of the medial collateral ligament as a landmark. The entry point for drilling was set a few mm proximal to the ligament with the direction of drilling being perpendicular to the bone surface. Drilling was made by introducing a 3.2 mm diameter drill, trying not to perforate of the second cortex. The thermal impact of drilling was limited by flushing the area with saline solution during drilling.



Fig. 2 Drilling

For the augmented specimens, prior to screw insertion, the drill hole was injected with Hydroxiapatite or Hydroxiapatite plus Fibronectin. The drill hole was completely filled, and any cement above the surface of the bone was removed prior to screw application. After the screw insertion, the incision was closed by suturing the subcutaneous layer with absorbable thread and the skin layer with non absorbable thread.



Fig.3 Drill hole injection

At the end of the study, the rabbits were euthanized by intravenous injection of Pentobarbital.

3.4 Analysis

To compare the screw fixation in our augmentation technique, samples were harvested at 24 h, 48h and 5 days in order to provide information about the effect of augmentation during the early course after fixation.

- Samples were analyzed

- Imaging (micro Ct): to describe trabecular bone morphometry we analyzed BVF (Ratio of the segmented bone volume to the total volume of the region of interest (%) mg/mm^3) and BMD (Bone mineral density (mg/cc), trabecular thickness (mm), and separation (mm). Micro- CT was an eXplore Locus SP provided by GE Healthcare. Each sample was scanned at 80kV/90mA source voltage/ current, with a 1 mm aluminum filter. The pixel size (resolution) was 0,017995 mm, rotation step was 0.5 over 360° and each image was averaged four times.
- Histologically.

The samples were fixed in 10% formol solution. After that, specimens were dehydrated in an ascending series of alcohol rinses and embedded using a process that produces thin ground sections with the glycol-metacrylate resin. After polymerization, the specimens were sectioned along their longitudinal axis with a high-precision diamond disc. Slides created for each implant, were stained with bone stain (Stevenel's blue) according to the manufacturer's instructions.

Results

4.1 Micro-CT

results:

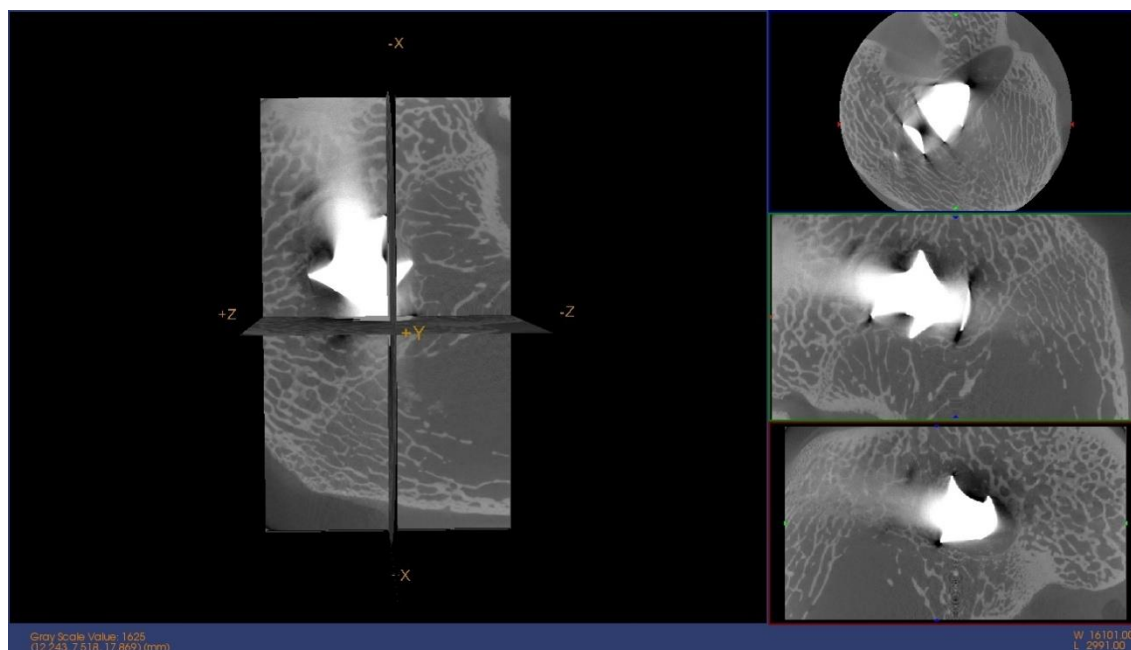


Fig. 4 Micro CT Image

Independent time analysis of samples, show no significant differences for BMD and BVF variables, although the median is slightly higher for the variable BMD in the sample with protein.

However we see an important trend for variables that define the trabecular bone microarchitecture, TbSp and TbTh. TbTh significance is $p = 0.1681$, which despite having no statistical significance ($p < 0.05$) due to the low number of samples analyzed is a representative value. The other variable, trabecular separation also shows a strong tendency to decrease, with the lowest values for the sample with protein.

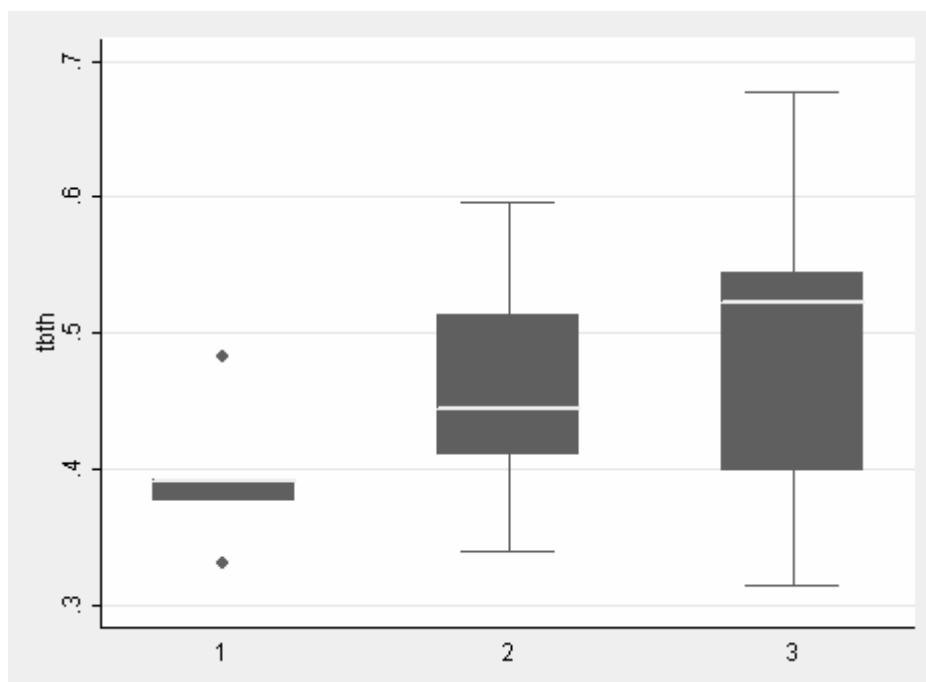


Fig. 5 TbTh Graphic time independent.

Dependent time analysis, show no significant changes for any of the variables.

Variables TbSp and TbTh (material and material plus protein) show a negative trend at 2 days, improving these values at 5 days.

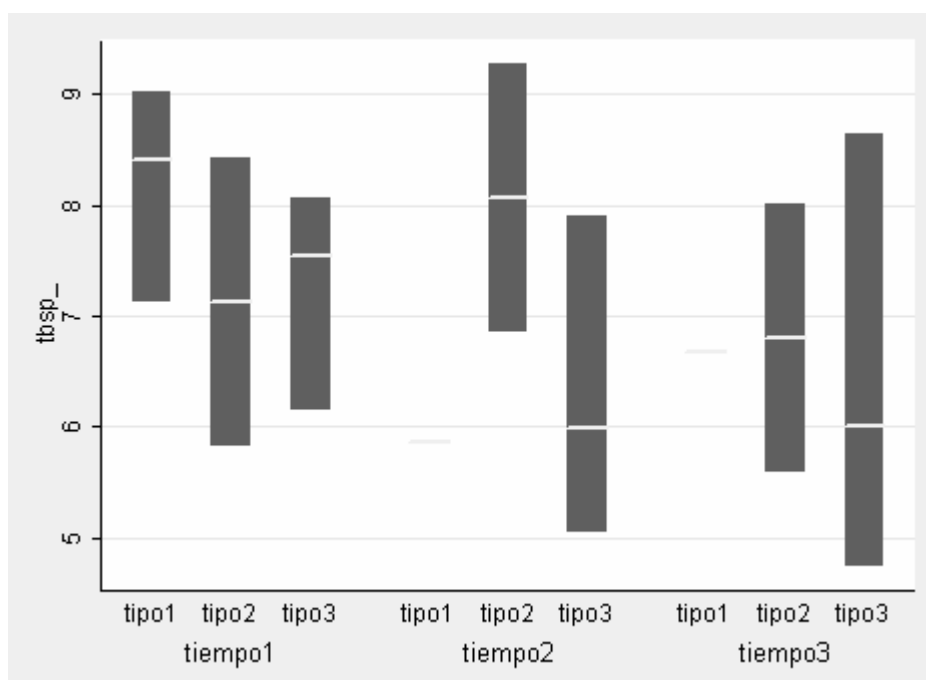


Fig. 6 Graphic TbSp time dependent

Comparative analysis: In order to determine whether or not the biomaterial increases bone screw fixation, comparisons are made between the areas near the screw (right, left and below) and an area farthest from it.

BVF and BMD variables did not show any statistically differences between the areas near the screw and away for any of the three types of samples (Control, Material, Material and plus Protein)

In the variables that define the trabecular microarchitecture, we observe statistical differences, obtaining in some cases with $p < 0.01$.

P=	Control (1)	HA (2)	HA+Protein (3)
Down-Far away	0,0679	0,0431	0,0117
Right-Far away	0,0679	0,0431	0,0117
Left-Far away	0,0679	0,0431	0,0117

Fig.7 Table TbTh results

P=	Control (1)	HA (2)	HA+Protein (3)
Down-Far away	0,0431	0,0277	0,0109
Right-Far away	0,0431	0,0277	0,0077
Left-Far away	0,0431	0,0277	0,0077

Fig.8. Table TbSp results.

4.2 Histological analysis.



Fig. 9. Histological sample. Blue Stevenel stain

The histological analysis shows a greater cellularity with protein samples from the rest from the first 24 hours. The number of inflammatory cells is low, in all sample types. Although we cannot identified the deposition of new bone we found increased amount of connective tissue protein in the samples.



Fig. 10. Protein sample 48h (connective tissue associated with the screw)

Discussion

Osteoporotic fracture is a growing problem. Osteosynthesis in an osteoporotic bone is a challenge for the surgeon, due to a reduced bone mineral density and different bone architecture. New systems such as locked plates attempt to provide a solution to this type of fracture; however the revision rates and osteosynthesis failures are significant.

To reduce these complications, the surgeon must be concerned that is not a bone of normal characteristics, so we must bring something complementary to achieve stable fixation.

We have different methods for augmentation, cements like PMMA or calcium phosphate. PMMA has good biomechanical properties, but low biocompatibility. Others such as calcium phosphates have osteoconductive properties but poor mechanical properties.

To improve the characteristics of bone and accelerate the consolidation process, one of the most common strategies nowadays is the use of scaffolds (calcium phosphates, polymers ...) plus osteoinductive materials like PRP or BMP. We could find promising results in animals, but not in clinical trials. The possible cause of these differences and poor clinical outcome may be the absence of standardized criteria for the required dose of PRP for each case. The amount of PRP obtained by the usual methods has a low concentration of growing factors. On the other hand the PRP perform their effect in living cells, that s why its use combined with synthetic materials, has poor results against its use with auto or allograft.

Another alternative are the BMPs, considered the most powerful osteoinductive proteins. Despite the good results obtained in animal models, it is difficult to reproduce in humans. There are several possible reasons:

- Dose? In humans we use supraphysiological doses, milligrams versus nanograms, which can also present a danger. It have been documented excess BMP pathologies
- Feedback: Another possible explanation is that excessively doses promotes activation of BMP inhibitors (noggin or escierostina)
- What type of BMP? It is not clear, which of the BMP is ideal. Perhaps, the greatest effect is achieved with a combination of several of them.

In our case we try an alternative strategy, calcium phosphate as scaffold and fibronectin as osteoinductive material.

In previous studies we can find a higher concentration of calcium in the matrix in the first week week (in vitro studies) , so we choose short times (24 hours, 48 hours and 5 days).

Although in our study we cannot say that there is new bone formation, we see improved parameters of trabecular bone morphology in the group of samples with protein from the other specimens. Also, the histological analyses of samples show an increase of non inflammatory cells in protein samples (OHAp-Fn) from the first 24 hours.

Through fibronectin and its sequence RGD we can direct and promote the bone regeneration process and achieve an early consolidation, reducing the number of complications that cause this type of fracture.

The main limitation of our study is essentially the number of samples analyzed. Further studies must be developed to demonstrate the long term effects of fibronectin and compare it with other biological methods such as BMP.

2. Introducción

2.1 BIOLOGÍA OSEA

2.1.1 Introducción

Sólo a partir del adecuado conocimiento de la estructura ósea, composición y relación de sus componentes con el resto del organismo, se pueden desarrollar soluciones para tratar los procesos patológicos que le afectan.

El hueso es junto con el tejido embrionario, la única estructura que permite la *restitutio ad integrum* cuando se daña o fractura.

En ocasiones la lesión producida es tan importante, que necesitamos de implantes o biomateriales para contribuir a la regeneración ósea, sin que estos alteren su biología.

.2.1.2 Composición

El hueso al tratarse de un tejido de sostén está constituido por dos componentes fundamentales, las células y el componente extracelular (matriz)

Esta matriz en el caso del hueso está mineralizada confiriéndole sus características de rigidez y dureza, 70% componente mineral y un 30% proteínas (1). También encontramos a las células encargadas de crear, destruir y conservar esa matriz para mantenerla regenerada.

Dado que nuestro biomaterial está compuesto por Hidroxiapatita y una proteína no colágena, Fibronectina, nos centraremos en el estudio del componente extracelular.

Matriz Orgánica

La matriz orgánica o sustancia osteoide representa un tercio del peso óseo. Esta constituida principalmente por proteínas (fundamentalmente colágeno de tipo I) que se encuentran incluidas en la sustancia fundamental.

El colágeno sintetizado por los osteoblastos proporciona al hueso propiedades elásticas y de resistencia a la tracción, controlando la deposición de cristales de hidroxiapatita en interviniendo en la regulación y diferenciación de distintas células (2).

La mayoría del colágeno es de tipo I (95%) también se han identificado otros tipos como el V, III y el XII. En la molécula de colágeno se haya la secuencia RGD (3), que sirve de anclaje las integrinas de distintas células óseas. Las fibras de colágeno se estabilizan mediante puentes de hidrogeno y no tiene una gran afinidad por el calcio, siendo otras proteínas las que están implicadas en el depósito del mineral.

Proteínas no colágenas:

-Proteoglicanos: Moléculas de gran tamaño que constituyen en torno al 10% de las proteínas no colágenas. Tenemos distintos tipos, por una parte Hialuronano y Condroitin sulfato, que intervienen en las etapas iniciales de la formación del hueso, y Biglicano y Decorina que aparecen en etapas más avanzadas de la morfogénesis ósea.

- Proteínas con ácido y carboxi-glutámico: Dentro de este grupo de proteínas no colágenas encontramos a, la osteocalcina y la proteína de la matriz. La osteocalcina es una proteína sintetizada por osteoblastos y plaquetas. Se creía hasta hace unos años, que era un iniciador o promotor del depósito de Ca^{2+} y por tanto un marcador de

formación ósea. Sin embargo estudios recientes con ratones *knock out* presentaban niveles de densidad ósea incrementados, sugiriendo por tanto que la osteocalcina inhibe la formación de hueso. Por todo ello hoy en día se la considera un marcador de reabsorción ósea (2)

-Glicoproteínas: Este grupo está integrado por la osteonectina, la fosfatasa alcalina y las proteínas con el tripeptido RGD (Arg-Gly-Asp) también conocidas como *SIBLINGS* (*Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein*) integrado por la osteopontina, las sialoproteínas óseas, fibronectina, tromboposdina y vitronectina. Son proteínas que intervienen en los procesos de remodelado y regeneración ósea con su secuencia RGD, reconocida por integrinas de osteoblastos y osteoclastos. También actúan como receptores de superficie permitiendo la adhesión celular a la matriz y la activación de señales.

-Proteínas procedentes del plasma: La albúmina y la α_2 -SH-glicoproteína. Se cree que intervienen en la incorporación de Ca^{2+} a la matriz.

-Factores de crecimiento: IGF I-II, TGF β , PDGF, sintetizados en el propio hueso o en otros tejidos y que intervienen en procesos de diferenciación y proliferación celular (4).

Matriz Mineralizada

El hueso está compuesto por entre un 50%-70% de mineral, 20-40% de matriz orgánica, 5-10% agua y menos de un 3% por lípidos.

La hidroxiapatita es el componente mayoritario del hueso ($\text{Ca}_{10}\text{PO}_4\text{OH}_2$). Comparado con la hidroxiapatita que encontramos en la naturaleza, la hidroxiapatita

del hueso son cristales más pequeños, sin llegar a superar los 200Å. Estos pequeños cristales son más solubles, con un menor grado de cristalización debido a variaciones en su composición (sustitución de grupos carbonato) favoreciendo el recambio y actividad metabólica.

La fase mineral de la matriz proporciona rigidez y resistencia mientras que la fase orgánica de la matriz aporta flexibilidad y elasticidad.

La formación de la matriz está asociada a la expresión de la fosfatasa alcalina y de distintas proteínas no colágenas, como son la osteocalcina, osteopontina y la sialoproteína ósea. Por medio de estas proteínas se regula el depósito del mineral, la forma y el tamaño de los cristales de hidroxapatita

2.2 FRACTURA OSTEOPOROTICA

La osteoporosis es la disminución de la masa del hueso que está bien mineralizado. En ella convergen múltiples mecanismos patogénicos para causar la pérdida de masa ósea y deterioro de la microarquitectura esquelética. Estos factores, junto con un mayor riesgo de caídas, contribuyen a una alta incidencia de fracturas por fragilidad en estos pacientes.

La fractura osteoporótica, no puede ser manejada de igual manera que una fractura en un hueso sano, en el que existe una estructura y unas propiedades biomecánicas normales. Los pacientes con fracturas osteoporóticas, tiene un mayor índice de complicaciones, debido a la propia patología osteoporótica que da lugar a un hueso enfermo con un pobre stock óseo y también debido en muchas ocasiones al cirujano, al realizar un tratamiento inapropiado sobre un hueso patológico. Distintos estudios observan tasas de no unión de entre 2-10%, mal alineación tras la cirugía 4-40%, fracasos en la osteosíntesis 1-10% y tasas de reintervención 3-23% (5,6).

Para tratar adecuadamente la fractura osteoporótica, es fundamental conocer las alteraciones en la estructura ósea, el mecanismo de consolidación y los métodos de osteosíntesis más adecuados para cada tipo de fractura. Lo ideal en estos pacientes es conseguir una fijación estable que permita la carga temprana.

2.2.1 Características del hueso osteoporótico

La densidad mineral ósea se reduce con la edad, también debido a otros factores como la disminución de los niveles de hormonas (estrógenos) o la menor actividad física que desencadena en una menor actividad anabólica en el hueso.

La pérdida de hueso cortical se manifiesta en un adelgazamiento y aumento de la porosidad. Esta reducción del hueso cortical acompañado de una disminución de la densidad y adelgazamiento trabecular lleva a un incremento de la fragilidad y a un aumento de la posibilidad de fracturas de baja energía.

No sólo se altera la densidad y el grosor de las trabéculas sino también su dirección. Hagiwara et al analizaron la orientación y distribución de las trabéculas en el hueso vertebral osteoporótico (7) Observaron una modificación en el patrón habitual con trabéculas con una orientación vertical fundamentalmente en el 1/3 anterior de la vertebra. Lo que justificaría el patrón típico de fractura vertebral osteoporótica, con acúñamiento anterior. En el fémur proximal debido a la reducción en el número de trabéculas del hueso esponjoso, se observa un aumento de trabéculas en el sentido de la carga axial. Esta modificación puede paliar en parte las alteraciones estructurales, siempre y cuando no se produzca una fuerza que no coincida con la dirección de las trabéculas, en cuyo caso el riesgo de fractura es alto (8).

También se ha analizado las características y grado de mineralización en el hueso osteoporótico. Se ha observado un aumento del tamaño de los cristales de hidroxapatita, el grado de mineralización del hueso osteoporótico está reducido, el contenido de carbonato está incrementado mientras que el de fosfato está reducido. Todo esto se traduce en una alteración en la microestructura del hueso (8,9).

El incremento en la porosidad y adelgazamiento del hueso cortical junto con la rarefacción del hueso esponjoso son compensados en parte por un incremento del diámetro del hueso.

La reducción progresiva de la densidad mineral ósea está directamente relacionada con la disminución de la resistencia del hueso. La pérdida de densidad afecta tanto al cortical como al esponjoso, pero lo hace de manera más dramática en éste último, lo que explica la presencia de mayor riesgo de fracturas osteoporóticas en aquellas zonas donde predomine el hueso trabecular (10,11).

2.2.2 Consolidación en hueso osteoporótico

En el proceso de consolidación podemos distinguir dos fases, una fase anabólica y otra catabólica, en la primera se observa una neoformación de hueso y en la segunda, que se solapa con la primera, la remodelación de un hueso inmaduro en un hueso trabecular y cortical (12).

En un inicio se produce una llegada de distintas células (granulocitos, macrófagos en una proporción 2 a 1 frente a los linfocitos) que por medio de la liberación de distintas citoquinas (TNF alpha, IL 1, IL 6) favorecen el proceso inflamatorio. A las 24h se observa un incremento de los linfocitos y un aumento de citoquinas reguladoras (IL 10, IL4) inhibiendo el proceso inflamatorio y promoviendo la llegada de distintas células mesenquimales. Distintos factores de crecimiento inducen la diferenciación de las células mesenquimales en condrocitos y fibroblastos, formándose así el callo fibroso o callo blando (13).

La importancia del hematoma en el foco de fractura está aún en entredicho. En estudios experimentales en ratas se ha observado que en aquellas en que se retiraba el hematoma, presentaban un retraso en la consolidación, sugiriendo por tanto que éste es fundamental en el inicio del proceso de consolidación promoviendo la

angiogénesis y la formación del callo a partir de distintos factores inflamatorios presentes en el hematoma. Por ello es preferible la utilización de métodos de fijación lo menos invasivos posibles, como el enclavado endomedular (14).

Se inicia posteriormente la osificación endocondral con la formación de hueso por acción de los osteoblastos, regulados por acción de las BMPs. Progresivamente el tejido óseo va sustituyendo al fibroso y los osteoblastos comienzan a secretar distintos marcadores (RANK-L) que promueven la diferenciación y activación de los osteoclastos para el inicio del remodelado y la formación de hueso trabecular y cortical.

Para que el proceso de remodelado sea un éxito hacen falta 3 factores esenciales:

- Activación de células mesenquimales pluripotenciales
- Liberación de factores de crecimiento
- Producción de factores que regulen el proceso

También resulta determinante la presencia de unas condiciones ideales:

- Adecuado aporte sanguíneo
- Contacto entre los fragmentos: La presencia de defectos de más de 2 mm han demostrado alterar el proceso de consolidación.
- Estabilidad del foco de fractura: Se ha observado que fuerzas de tensión intermitentes favorecen la osificación endocondral y fuerzas de compresión intermitentes promueven la osificación intramembranosa. Mientras que fuerzas transversales son deletéreas para el proceso de consolidación. Por

tanto es muy importante la elección del implante para que no sea excesivamente rígido o cause inestabilidad en el foco de fractura (15).

Las causas y si realmente existe una alteración en el proceso de consolidación en el hueso osteoporótico aún no están muy claras. Distintos estudios experimentales en animales intentan aportar algo de luz en este tema (16).

Hill et al desarrollaron un estudio experimental con ratas ovariectomizadas a las que se les provocaba una fractura 6 semanas después de la cirugía. Observaron una reducción estadísticamente significativa en la resistencia a la torsión en el grupo osteoporótico a partir de los 30 días (17).

Namkung et al demostraron por primera vez la existencia de una menor densidad mineral ósea en las fases iniciales del proceso de consolidación de una fractura en ratas ovariectomizadas y en tratamiento con corticoides (18).

Lill et al realizaron estudios biomecánicos y observaron un retardo en la consolidación, de unas 2 semanas, en un modelo de oveja osteoporótica (ovariectomía+corticoides), pero no encontraron diferencias significativas en cuanto a resistencia final del hueso osteoporótico y del sano (19).

Aunque el retardo en la consolidación de la fractura osteoporótica no es evidente, la alteración del proceso de consolidación de las fracturas se refleja en el aumento de los fallos en la osteosíntesis (20).

Las posibles razones son diversas, por una parte se ha observado la importancia del hueso inmaduro que forma parte del callo en la estabilización inicial de las fracturas. Este hueso inmaduro es sensible a la acción de los estrógenos, por tanto no es

descabellado pensar, que en una paciente con una osteoporosis por déficit de estrógenos, el proceso de consolidación este alterado (21).

También se ha observado como los estrógenos, a través de las prostaglandinas, regulan la mecanotransducción en el tejido óseo. Por tanto en la mujer post menopáusica el proceso de consolidación se verá alterado, ya que las fibras de colágeno no se dispondrán en el sentido de las fuerzas predominantes (22).

Por otra parte en la osteoporosis senil se evidencia un descenso en el número de células madre mesenquimales, y no sólo eso sino que además éstas son menos receptivas a señales que promueven la diferenciación hacia hueso o cartílago, observando un incremento del tejido adiposo. Existe una menor capacidad osteogénica, también debida a una menor producción de señales estimuladoras como el TGFb. Todo ello conlleva una alteración en el proceso de consolidación (23, 24).

2.2.3 Osteosíntesis en Osteoporosis.

2.2.3.1 Problemas de fijación en fractura osteoporótica

El principal problema de la osteoporosis no es tanto la consolidación del hueso, sino mas bien la falta de fijación del material de osteosíntesis en un hueso con una resistencia mecánica disminuida (25).

La pérdida de resistencia del hueso debido a una menor masa ósea se compensa en parte en las zonas diafisarias con un aumento del diámetro del hueso. Este mecanismo no es válido para el hueso esponjoso de las aéreas metafisarias, siendo estas las zonas de mayor riesgo de fractura (26).

La fractura osteoporótica es un reto para el cirujano, no sólo tiene que tratar con un hueso debilitado sino además con un paciente complejo. Suelen ser pacientes añosos, en muchos casos pluripatológicos, con patologías arteriales que pueden causar isquemia de los tejidos dificultando aun más el proceso de consolidación. La inmovilización a la que se los somete después de la intervención quirúrgica agrava aún más si cabe la reabsorción ósea.

Por tanto el reto es conseguir una fijación estable de las fracturas que permita una movilización temprana y una carga completa precoz (27).

La deficiencia de hueso cortical y trabecular ofrece un área de fijación reducida, en la que la posibilidad de una osteosíntesis estable disminuye con respecto a un hueso no patológico. Es un hueso menos resistente y flexible, por lo que fijaciones excesivamente rígidas conducen a un fallo de la interfaz hueso-implante y al fracaso de la osteosíntesis. El fallo del implante se suele producir antes de que la fractura llegue a consolidar (25).

La osteosíntesis debe ser lo más flexible posible y permitir una distribución uniforme de las cargas en una superficie lo más amplia posible, para reducir el stress entre implante y hueso (28).

Implantes que sustentan su fijación en el agarre del tornillo, son más dependientes de la calidad del hueso que otros como el enclavado endomedular, que tiene una mayor flexibilidad sin que ésta altere su resistencia y estabilidad de la fractura. Sin embargo implantes excesivamente flexibles pueden causar un movimiento desmedido de los

fragmentos que conduzca a un retardo de la consolidación, movilización del implante y fracaso de éste (29).

Con los fijadores externos los pines no actúan como tornillos y por tanto el agarre de éstos no es determinante. El sistema creado por el marco del fijador, los pines y el hueso es intrínsecamente estable, permitiendo ligeros micromovimientos que no alteran la estabilidad sino que además contribuyen a la consolidación. Sin embargo la infección de los pines, la falta de reducción y el trastorno que producen estos implantes, hace que no sean muy recomendados sobretodo en personas de edad avanzada y en miembros inferiores (30).

La osteosíntesis con placas como ya hemos comentado anteriormente depende en gran medida, del agarre del tornillo al hueso. Cuando el tornillo fija la placa al hueso, las fuerzas aplicadas sobre el hueso se transforman en una fuerza de fricción sobre la placa. Mientras este momento de fricción sea mayor que la fuerza aplicada el sistema se mantiene estable. En el momento que la fuerza aplicada supera al momento de fricción el tornillo comienza a moverse, lo que supone el fracaso del implante. Como estos tornillos dependen en gran medida de la superficie de contacto, se recomienda que sean de un diámetro ancho y siempre que sea posible bicorticales.

Para intentar conseguir una fijación estable, independiente del contacto entre hueso y tornillo se han desarrollado las placas bloqueadas. Estas placas permiten el anclaje del tornillo a la placa, formando una estructura única que reparte las fuerzas a lo largo de ésta. La posibilidad de fallo del implante se reduce enormemente, de hecho los fallos de placas bloqueadas suelen ocurrir por fallo en la técnica quirúrgica. Aunque ya existen dispositivos que permiten la angulación del tornillo hasta un cierto número de

grados, estudios biomecánicos demostraron que un error de unos 10° en el tornillo incrementaban un 70% las posibilidades de fallo del implante (31).

La sustitución protésica se debe limitar a fracturas articulares y algunas metafisarias, como las de fémur proximal, en las que las posibilidades de éxito de la osteosíntesis sean muy bajas. La cirugía de recambio protésico también se debe indicar en situaciones en las que existe una osteoartritis avanzada concomitante y altas demandas funcionales (32).

La placa bloqueada:

La necesidad de solucionar los problemas que se derivaban del uso de placas convencionales como retardos de consolidación, no unión, refractura al retirar el implante...y sobre todo la necesidad de conseguir una fijación estable en hueso osteoporótico desembocan en la creación de la placa bloqueada.

Desarrollada por hace unos años el sistema *Pc Fix* que funcionaba con los principios de un fijador externo, fue el primer dispositivo que se creó (33).

Posteriormente surge el sistema LCP que proporciona una estabilidad axial y angular con placas preconformadas, que no necesitaban moldearse para adaptarse al hueso. Por último surge el sistema LISS que combina las ventajas del sistema LCP, preservando además la adecuada vascularización de los tejidos al permitir un abordaje mínimamente invasivo (34).

Hoy en día, la placa bloqueada se utiliza para cualquier tipo de fractura y sin tener en cuenta sus propiedades biomecánicas, lo que hace que la mayor parte de los fracasos sean debidos a una mala técnica quirúrgica.

Las placas bloqueadas pueden conseguir una fijación estable aunque exista una calidad de hueso precaria. Estas placas convierten las fuerzas de cizallamiento en fuerzas de compresión en la interfaz hueso –placa, haciendo que la fijación sea estable, ya que el hueso tiene una mayor resistencia a la compresión frente a otras fuerzas como el cizallamiento. La fijación es aún más estable gracias a la estabilidad axial y angular que aportan estas placas (35).

Además como la placa no ejerce fuerzas de fricción sobre la superficie del hueso como las placas convencionales, el aporte sanguíneo de la superficie del hueso no se altera, lo que reduce la reabsorción ósea y por tanto los retardos de consolidación, no unión... (36)

Otra de las ventajas que tiene la placa bloqueada es la posibilidad de usar tornillos unicorticales (37). El tornillo unicortical tiene una serie ventajas frente al bicortical:

- Fácil medición e implantación y mayor respeto por la circulación endostal

Sin embargo debemos tener en cuenta, que para que haya un buen agarre del tornillo, debemos disponer de una cortical adecuada, y que en hueso metafisario la fijación puede ser insuficiente debido a unas corticales de menor grosor (38).

El número de corticales necesarias, es controvertido, se acepta que si es un fractura simple al menos 4 corticales por fragmento y si es una fractura compleja 6 corticales (37).

La existencia de placas híbridas (tornillo convencional y bloqueado) aportan una gran versatilidad permitiendo combinar ambos tipos de fijación. Por una parte podemos dar

compresión a la fractura con el tornillo convencional y con el bloqueado aportamos la estabilidad necesaria al implante (38).

El tipo de placa a utilizar debe elegirse en función del tipo de fractura, su localización y el tipo de hueso.

La placa bloqueada resulta ideal en situaciones en las que realizamos una reducción indirecta de la fractura, en fracturas diafisarias y metafisarias en hueso osteoporótico y fracturas conminuta (33).

Las complicaciones tras el uso de placas bloqueadas, surgen muchas veces por no conocer las características biomecánicas de la placa. Por ejemplo, las tasas de no unión van del 0 al 10%. En distintos estudios se observó que en aquellas fracturas con una reducción indirecta, en las que se le daba demasiada rigidez al montaje colocando tornillos demasiado cerca del foco, las tasas de no unión eran muy superiores frente a otras que tenían los bloqueos más alejados del foco.

También se ha podido constatar que hay mayor número de fracturas perimplante, en aquellas situaciones en las que el último bloqueo de la placa es bloqueado bicortical, frente a bloqueos unicorticales o con tornillos convencionales (39).

2.2.3.2 Fractura osteoporótica de fémur proximal:

Se trata de una fractura muy frecuente en el paciente con osteoporosis, y sin duda la que mayor número de complicaciones, incluso fatales y comorbilidad genera en los pacientes. La movilización temprana reduce las complicaciones, tales como las úlceras por presión, la trombosis, el tromboembolismo pulmonar, infecciones de vías respiratorias y urinarias (40).

Incluso con una osteoporosis grave se puede lograr una carga completa después de la intervención tras fractura de fémur proximal.

- Implantes:

Para la fijación de fracturas de cuello femoral, habitualmente en fracturas no desplazadas (Garden I, II) se realiza una osteosíntesis con tornillos canulados (3 o 4) y para fracturas desplazadas (Garden III, IV) se realiza una hemiartroplastia de sustitución.

En pacientes con una mala calidad ósea es preferible la utilización de implantes que consigan una estabilidad adecuada como el tornillo placa deslizante. La utilización de estos implantes para este tipo de fracturas no es frecuente, el hecho de que la cirugía con tornillos sea rápida, sencilla y se haga de manera percutánea hace que el DHS no sea muy utilizado. Sin embargo la fijación con tornillos en un hueso osteoporótico parece insuficiente, con tasas de reintervención a corto y medio plazo altas. En un estudio de 25 fracturas de cuello femoral no desplazadas, en las que el implante utilizado fue el DHS, solo en 2 de ellas hubo que revisar la cirugía en los dos primeros años. Por tanto la utilización de este tipo de implantes, con placas de dos agujeros frente a las de 4 (no se observan diferencias y presentan un mayor respeto por las partes blandas) debería convertirse en la técnica de elección en fracturas osteoporóticas de cuello femoral no desplazadas (41).

En cuanto a las fracturas que afectan al espacio extracapsular el patrón oro para las fracturas estables sigue siendo el tornillo placa deslizante, además de ser más barato. Los implantes intramedulares poseen ventajas biomecánicas frente a este tipo de

implantes extramedulares sólo en las fracturas inestables. La primera y segunda generación de implantes intramedulares presentaban tasas de complicación significativas, sobre todo debido a la aparición de fracturas perimplante. La tercera generación de clavos ha reducido estas complicaciones, sin embargo la consolidación en varo de la cabeza femoral y la migración de la lámina siguen planteando problemas (42). El “*cut out*” o migración a través de la cortical lateral de la lámina del clavo, es una de las causas más frecuentes de reintervención, los nuevos sistemas de aumento para el hueso osteoporótico que aportan cemento (PMMA) a través de la lámina del tornillo, intentan proporcionar una mayor estabilidad al montaje (43).

En las fracturas subtrocanterea, los implantes más utilizados son los enclavados intramedulares, otra posibilidad que va ganando adeptos debido a su baja tasa de complicaciones son las placas a 95°, sin embargo son más exigentes y precisan de un cirujano experto para su implantación. Este tipo de implantes también puede utilizarse en fracturas pertrocanterea de trazo invertido (44)

○ Complicaciones

El “*cut out*” es la complicación más frecuente, se debe principalmente a una mala técnica quirúrgica. La lámina del clavo debe situarse en posición centro-centro o centro-inferior en la cabeza femoral. Baumgartner et al (45) demostraron la importancia de la distancia entre la punta del tornillo cefalomedular y el ápex de la cabeza femoral, “*tip-apex*”, en este tipo de fracturas. Si esta distancia (TAD) era mayor de 25mm se incrementaba de manera significativa el riesgo de “*cut out*”, varización y de no unión de las fracturas.

Otra de las complicaciones con este tipo de implantes son las fracturas de la diáfisis femoral. Más frecuentes en el postoperatorio inmediato que de manera intraoperatoria. Debidas fundamentalmente al diseño de los dispositivos, principalmente los de 1 generación (*Gamma nail*) con un diseño que no se adaptaba en muchos casos al fémur del paciente (implante demasiado largos, 10° de valgo). Los nuevos dispositivos con una menor curvatura, mayor variedad de tamaños y sistemas de bloqueo más precisos han conseguido reducir estas complicaciones al 2-3% de manera intraoperatoria y entre el 0-4,5% en el postoperatorio (46).

2.2.3.3 Fractura osteoporótica vertebral

Es la fractura osteoporótica más común, afectando principalmente a los cuerpos vertebrales lumbares y a la zona de transición toraco-lumbar. Sólo un 25% de estas fracturas se originan debido a caídas, la mayoría de ellas se producen realizando actividades de la vida diaria, levantamiento de objetos, o incluso simplemente con la flexión del tronco (47).

○ Tratamiento

El tratamiento clásico de la fractura vertebral osteoporótica, era el reposo en cama y analgésicos. Con este tratamiento es difícil restaurar la biomecánica de la columna y la inmovilización a la que se le sometía al paciente, conducía a una disminución de la masa ósea que podía incluso agravar la situación con nuevas fracturas al reiniciar la actividad.

Para aliviar el dolor y restaurar la biomecánica de la columna, surgen en los años 80 alternativas menos invasivas que la fijación abierta, la vertebroplastia y la cifoplastia. Ambos métodos se pueden realizar con anestesia local en ocasiones y con una duración de unos veinte minutos por nivel.

El objetivo de ambos métodos es la estabilización de la arquitectura del cuerpo vertebral, reduciendo el micro-movimiento que causa el dolor. Además la Cifoplastia consigue recuperar la altura del cuerpo vertebral, reduciendo la cifosis y recuperando la biomecánica natural de la columna.

En un estudio retrospectivo con un gran número de pacientes, el tratamiento percutáneo de la fractura vertebral, demostró ser muy superior frente a la terapia conservadora, siendo mejores estos resultados con la Cifoplastia que con la Vertebroplastia, en cuanto a dolor o reincorporación a la actividad diaria (48). Con la excepción de aquellos pacientes que presentaban clínica neurológica concomitante, en los que el tratamiento percutáneo era insuficiente y necesitaban de descompresión abierta y fijación interna (49).

- Vertebroplastia

Esta técnica se realiza por primera vez en 1984, para el tratamiento de los Hemangiomas vertebrales (50). Más tarde comienza a utilizarse en el tratamiento de la fractura osteoporótica por compresión.

Se trata de una técnica sencilla en la que de manera percutánea, se accede al cuerpo vertebral a través del pedículo, bajo control radiográfico (proyecciones anteroposterior y lateral) infundimos cemento de baja viscosidad (51).

La Vertebroplastia permite disminuir el dolor, pero no otras complicaciones de la fractura al no restaurar la altura del cuerpo vertebral.

- Cifoplastia

Es el equivalente de la Vertebroplastia, con la ventaja que restaura la altura del cuerpo vertebral con la introducción de un globo. (52).

En cuanto al tipo de cemento, existen formas de PMMA puro, actualmente también existe PMMA más fosfato cálcico que aporta osteoconductividad.

Estos cementos requieren una preparación de unos diez minutos y tras infundirlos es necesario dejarlos actuar unos veinte minutos para que fragüen. Las fugas del cemento se pretenden evitar al introducir materiales de alta viscosidad a presiones bajas.

- Algoritmo de tratamiento

Estaría indicado el tratamiento con las técnicas percutáneas en los siguientes casos:

- Fractura-aplastamiento sin déficit neurológico
- Fractura traumática estable dolorosa
- Tratamiento conservador no consigue mejoría tras 4 semanas

Los mejores resultados se obtienen con la Cifoplastia en fracturas agudas (49, 53).

En fracturas con criterios de inestabilidad, cifosis de más de 20°, espondilolistesis, afectación neurológica se debe realizar una fijación interna y reducción abierta (54).

Por tanto las recomendaciones serían tratar de manera conservadora aquellas fracturas simples por compresión, en las que no hay una importante pérdida de altura. Si hay una pérdida de altura significativa, existen fracturas a varios niveles o no existe respuesta al tratamiento conservador podemos realizar una técnica percutánea. Para ampliar el diagnóstico y poder elegir la técnica más adecuada es necesario completar el estudio con una Resonancia Magnética.

- **Contraindicaciones técnicas percutáneas**

La afectación de los elementos posteriores (fractura inestable), la afectación del canal medular o las infecciones (osteomielitis, espondilodiscitis) son contraindicaciones absolutas.

La afectación radicular o el largo tiempo de evolución (más de 2 meses) son indicaciones relativas para estos tratamientos.

No se recomienda el tratamiento profiláctico de la fractura vertebral osteoporótica en pacientes con dolor controlado. Ni tampoco se recomiendan estas técnicas para tratar el dolor derivado de una patología discal degenerativa (54).

- **Complicaciones**

La tasa de complicaciones con estos procedimientos se sitúa en el 1% en la fractura osteoporótica y en torno al 10% en la fractura patológica (55).

La mayoría de estas complicaciones son irrelevantes. Una de ellas son las fugas de cemento (56), que según distintos estudios se sitúan entre el 1 y el 5%. En la mayoría de los casos son manchas radiológicas (disco, zona paravertebral, tejidos blandos) sin mayor trascendencia y de carácter asintomático, pero en ocasiones pueden ser causa de complicaciones potencialmente graves e incluso mortales.

Si el cemento pasa al espacio epidural están descritas complicaciones como las radiculopatías e incluso la paraplejia (57). Si llega al plexo venoso vertebral puede causar embolias pulmonares e incluso embolias paradójicas a cerebro o riñón. Esta posibilidad depende de la porosidad del hueso y de las características del cemento.

Otra complicación grave es la aparición de fracturas en los niveles adyacentes. Está descrito hasta un 16,5% de posibilidades de fractura dentro del primer año tras el tratamiento. Se cree que puede ser debido a un incremento de la rigidez por un llenado excesivo de cemento. En realidad sólo se necesitan pequeños volúmenes de cemento para restaurar la estructura vertebral y cantidades excesivas conducen a un incremento de estrés en la zona. Estas fracturas suelen aparecer en la zona de transición toraco-lumbar (58).

En resumen se puede concluir que con una colocación óptima del globo, una viscosidad adecuada del cemento, una velocidad de aplicación controlada y un control de las extravasaciones la posibilidad de que surjan complicaciones es muy baja. Casi todos estos factores están influenciados por la experiencia del cirujano.

○ Resultados

El 90% de los pacientes según diferentes estudios presentan una reducción importante del dolor y expresaron su satisfacción con el resultado (59). Se piensa que la reducción del dolor se debe a la estabilización de la fractura y a la reacción exotérmica del cemento (80°) que alteraría la respuesta nociceptiva de las terminaciones nerviosas(60).

Si tratamos estas fracturas además conseguimos:

- Mantenemos lordosis fisiológica y la biomecánica natural de la columna.
- Reducimos la aparición de otras fracturas osteoporóticas al reducir las caídas
- Evitamos la reducción de la capacidad vital pulmonar que asocia la fractura vertebral torácica.

2.2.3.4 Fractura osteoporótica de húmero proximal

La fractura de húmero proximal es la cuarta fractura osteoporótica más común después de las de columna vertebral, fémur proximal y radio distal. Suele afectar a personas mayores de 60 años, que sufren caídas desde su propia altura.

Para tipificar este tipo de fracturas, existen diversas clasificaciones. La primera que aparece es la de Codman basada en los 4 fragmentos (troquiter, troquín, cabeza y cuello). En 1970 Neer modifica esta clasificación (61), al tener en cuenta el número de fragmentos y el grado de desplazamiento. Fractura desplazada, es aquella en la que la distancia entre los fragmentos es mayor de 1 cm o con una angulación de 45°. Neer no

tenía en cuenta formas especiales como las fracturas impactadas en valgo o las fracturas *“head split”*.

En 1990 la AO (62) crea su clasificación, dividiendo a las fracturas en extra-articulares, articular parcial y articular, pero el gran número de grupos y subgrupos hace que sea difícil su uso en la práctica diaria.

En 2005 Hertel (63) crea una clasificación basándose en la clásica de Codman, pero añadiendo criterios adicionales como el trazo de fractura o la impactación en varo o valgo, que añade factores pronóstico a la fractura. Son criterios de mal pronóstico:

- extensión metafisaria dorsomedial(+8mm)
- afectación de la bisagra medial
- impactación en varo
- fracturas *“head split”*
- fragmentos de menos de 8mm
- desplazamientos de más de 6mm

La Resonancia Magnética puede aportarnos información adicional acerca del estado del manguito rotador y el estado de la vascularización de la zona.

○ Tratamiento conservador

En la elección del tipo de tratamiento debemos tener en cuenta diversos factores como son el tipo de fractura, la edad del paciente, la posibilidad o no de realizar el tratamiento (ej. demencia) y el deseo del paciente.

Entre el tratamiento conservador y el quirúrgico, no hay un consenso unánime de cuando utilizar uno y otro. Krettek y Wiebking (64) no encontraron diferencias significativas en el miembro fracturado tratado de manera conservadora, y el lado no lesionado utilizando la escala Constant.

Otros estudios compararon las complicaciones y la necesidad de reintervención después de uno y otro tratamiento. Encontraron un 34% de complicaciones después de la cirugía frente al 28% del tratamiento conservador y unas tasas de revisión del 19% en el tratamiento quirúrgico frente al 7,2% del conservador (65).

En fracturas simples, la terapia conservadora tiene unos resultados satisfactorios, no así en las complejas (3 o 4 fragmentos) donde los resultados funcionales y el rango de movimiento son peores que en otras opciones de tratamiento. Sin embargo esto no supone un impacto importante en la calidad de vida, por lo que el tratamiento debe ser consensuado con el propio paciente (66).

Estos buenos resultados del tratamiento conservador llevaron a Krettek a recomendar esta terapia en pacientes menores de 60 años y grado I de la clasificación de Neer y mayores de 60 años en los que la fractura no sea abierta, patológica o asociada a luxación.

Hoy en día las recomendaciones de tratamiento conservador son (67):

- Fracturas estables
- Angulación de menos de 20°
- Desplazamiento menor de 5mm

En el tratamiento no quirúrgico se inmoviliza el miembro con cabestrillo una semana, iniciando movimientos pendulares en la segunda y ejercicios pasivos en la tercera semana. Durante el desarrollo de la terapia se deben realizar radiografías cada 3-6 semanas para evitar desplazamientos secundarios, que nos hagan replantear el tipo de tratamiento.

- Tratamiento quirúrgico

En la actualidad las indicaciones de tratamiento quirúrgico más aceptadas son (68):

- Fracturas del troquiter + 2mm de desplazamiento asociadas roturas del manguito
- Fracturas del cuello quirúrgico + de 5mm de desplazamiento o más de 20° de angulación.
- Fracturas del cuello anatómico
- Fracturas-luxaciones

En cuanto a la elección de uno u otro implante las recomendaciones actuales son (69):

- Fractura en dos fragmento- enclavado intramedular
- Fractura en tres fragmentos- placa
- Fracturas complejas- artroplastia
- En cuanto a las fracturas en cuatro fragmentos, no hay ninguna recomendación establecida.

El beneficio de esta terapia frente a la conservadora es la reincorporación más precoz a la actividad diaria, en el caso de los ancianos, permite una movilización precoz y un mayor grado de independencia.

El enclavado endomedular es ideal para las fracturas en dos fragmentos y las espiroideas largas. La principal ventaja de este implante es el respeto por las partes blandas con la excepción de la apertura del supraespinoso para poder realizar el punto de entrada. Hoy en día se propugna la utilización de la artroscopia para la visualización y control del punto de entrada del clavo, evitando las complicaciones de un acceso erróneo (mayor desplazamiento de los fragmentos) (70). La tasa de complicaciones es comparable a la osteosíntesis con placa y los resultados funcionales comparables a la prótesis primaria.

En fracturas osteoporóticas con 3 o 4 fragmentos la placa es el método quirúrgico de elección. Los nuevos diseños de placa permiten una fijación estable, pese a tratarse de un hueso osteoporótico, gracias a la posibilidad de dirigir tornillos a la zona medial-inferior (calcar) (71). Estos implante permiten un abordaje menos invasivo que los anteriores reduciendo las posibilidades de sangrado o infección. Las complicaciones más comunes son las consolidación en varo y la perforación de la cabeza con los tornillos. Distintos estudios, entre ellos el de Krappinger, establecen una relación entre la presencia de complicaciones y la calidad del hueso (72). Otros estudios como el de Hepp no han encontrado tal asociación (73).

Para el tratamiento de algunas complicaciones como por ejemplo, tornillos que protruyan en la articulación, se recomienda la utilización de métodos menos invasivos

como la artroscopia. Además de esta manera se pueden tratar otras complicaciones asociadas como la artrofibrosis pudiendo realizar en el mismo acto una artrolisis.

La realización de una artroplastia de manera primaria en fracturas de húmero proximal, debe considerarse en fracturas complejas en hueso osteoporótico, fracturas-luxaciones con un gran desplazamiento o fracturas “*split*” de la cabeza. Las indicaciones de una prótesis total de hombro deben restringirse a pacientes jóvenes con omartrosis y con un manguito rotador viable. En el paciente anciano (>75 años) con una gran osteoporosis, en el que las tuberosidades estén muy desplazadas y el manguito rotador no sea viable, la prótesis invertida es la opción más adecuada (74). Distintos estudios propugnan la reinserción de las tuberosidades siempre que sea posible (75).

2.2.3.5 Fractura osteoporótica de radio distal

Debido al envejecimiento progresivo de la población, es una fractura que se prevé que experimente un aumento en su incidencia en los próximos años. (76).

Las opciones terapéuticas no solo dependen del tipo de fractura y la condición general del paciente, sino también de las posibilidades de cumplimiento del tratamiento, la experiencia del cirujano o la logística.

○ Tratamiento conservador

Es el tratamiento de elección en las fracturas no desplazadas, A1 y A2 (AO). No esta tan claro sus indicaciones en la A3 debido a la conminución metafisaria y posibilidad de desplazamiento secundario. En algunos casos seleccionados fracturas tipo B1 o C1 no desplazadas también pueden ser tratadas de manera no quirúrgica. Resultan

fundamentales los controles radiológicos a los 4, 7 y 11 días para comprobar la evolución de la fractura. La inmovilización debe mantenerse entre 4-6 semanas. En el metanálisis de Handoll (77), no observan diferencias entre el tratamiento conservador y el quirúrgico en pacientes ancianos, si determinan que aquellos que se operaban recuperaban antes la funcionalidad de la muñeca.

- Fijación con agujas

La ventaja de la fijación con agujas de Kirschner es la baja invasividad, bajo coste, y la disponibilidad de este método de fijación. Sus indicaciones de uso serían en fracturas A2, A3, B1 y C1 de la clasificación de la AO.

En pacientes jóvenes con una buena calidad ósea, se puede llegar a conseguir una fijación estable, no así en pacientes ancianos con mala calidad ósea en los que si además asociamos conminución metafisaria, o angulaciones de más de 20° las posibilidades de éxito son muy bajas. Además otra desventaja de este tipo de fijación, es la necesidad de asociar otro elemento de inmovilización adicional. Handoll (78) no encontró diferencias estadísticamente significativas entre la fijación con agujas y la terapia conservadora.

- Tornillos de fijación.

Fracturas tipo A2, B1, B2 o C1, es infrecuente la utilización de este método de fijación. Presenta a su vez la desventaja de tener que asociar la inmovilización de la fractura.

- Fijador externo

Actualmente sus principales indicaciones son fracturas abiertas, cuando existe un importante daño de partes blandas, la presencia de un importante edema que impide la cirugía, o fracturas de una gran complejidad (C2, C3) (79).

Este tipo de implantes se ha relacionado con un mayor número de casos de síndrome doloroso regional complejo, debido a que no permiten una movilización temprana. Para evitar esta complicación se han desarrollado fijadores dinámicos que permiten cierta movilidad pero que añaden una importante inestabilidad, por lo que no reducen el número de complicaciones.

En un meta análisis (80) este tipo de tratamiento no mostró mejores resultados frente al tratamiento conservador, aunque si una mejor reducción de la fractura. Sin embargo hay que tener en cuenta que el grado de complejidad de las fracturas en las que se suele utilizar el fijador externo, es mucho mayor que en las que se hace un tratamiento conservador. En cuanto a su comparación con la fijación con agujas, si que se mostró superior (81).

- Placa

En los últimos años se ha convertido en el tratamiento de elección en este tipo de fracturas (82, 83). Hasta el 90% según diferentes estudios. La aparición de las placas de ángulo variable, ofrece importantes ventajas en fracturas de tipo C2, C3 gracias a la posibilidad de colocar tornillos en distintas posiciones, mejorando la estabilidad y reduciendo las complicaciones. Sin embargo no existen estudios que comparen ambos tipos de placa, y que puedan determinar cuál es superior. Los resultados con este tipo

de placas, son buenos a muy buenos, pero con unas tasas de complicaciones que van desde 8 al 40%. Como complicaciones destacan el dolor postoperatorio, irritaciones del tendón, síndrome del túnel carpiano, síndrome del dolor regional complejo, tornillos intrarticulares (84).

- Osteosíntesis intramedular

Solo existe un pequeño número de estudios con este tipo de implantes. En un estudio aleatorio prospectivo se comparó este implante con la placa volar bloqueada. Aquellos pacientes tratados con el clavo presentaban menos dolor y una recuperación funcional más rápida. Sin embargo estaría contraindicado en las fracturas C2 y C3. (85).

2.3 BIOMATERIALES

¿Qué es un biomaterial? Se trata de un material creado para tratar o sustituir un tejido, órgano o función del cuerpo (86). Una de sus características básicas es la biocompatibilidad, entendida como la capacidad de ese material para desarrollar su función sin interferir ni provocar una respuesta negativa por parte del huésped. No sólo deben ser biocompatibles sino que además deben favorecer la regeneración ósea, reemplazándose por el nuevo hueso o al menos no interferir con él y presentar propiedades mecánicas similares al esqueleto (87).

Existen biomateriales de origen humano, autoinjerto, aloinjerto... y sintético, en este caso nos centraremos en los de origen sintético.

2.3.1 Biomateriales de origen sintético

Los injertos de origen sintético presentan dos de las cuatro características del autoinjerto, son osteoconductores y osteoinductores.

Podemos diferenciar entre biomateriales de origen orgánico e inorgánico (metálicos, cerámicas y cementos)

Biomateriales de origen inorgánico. Cemento

A diferencia de las cerámicas, los cementos no precisan de altas temperaturas para su formación, sino que consiguen la creación de una estructura estable in vivo. Este biomaterial surge inicialmente como alternativa a los materiales conformados. Debido a su presentación en forma de pasta puede rellenar aquellos defectos a reparar.

Dependiendo de la necesidad clínica se han desarrollado cementos en distintas presentaciones granulados, inyectables, en forma de estructuras tridimensionales para que actúen como soporte.

- Cementos como soporte: Para poder utilizar este biomaterial como soporte o andamio es fundamental que presente una estructura macroporosa. Por medio de estos poros se guía el crecimiento y la regeneración del tejido. El gran inconveniente del cemento es que no dispone de estos macroporos para servir de andamiaje. Para crearlos sin alterar o alterando lo menos posible las características del material se han creado distintas estrategias: Agentes porógenos (azúcares), emulsión, liofilización y gas
- Cementos inyectables: La gran ventaja de esta forma de presentación es su plasticidad y su capacidad para adaptarse al defecto. Útiles en técnicas mínimamente invasivas y para defectos óseos de difícil acceso.

Mediante la modificación de su estructura y la ratio fase sólida/ fase líquida podemos modificar sus características y así adaptarlos a distintas situaciones. Una ratio L/S baja implica una baja porosidad pero alta resistencia a las fuerzas de compresión mientras que ratios L/S altas implican una más fácil aplicación pero peores propiedades mecánicas.

- Cementos granulados: Otra forma de presentación, es en forma de gránulos. Tiene la gran ventaja de ser una estructura porosa que permite dirigir y favorecer el crecimiento del tejido a través de éstos. Su moldeabilidad permite la adaptación al defecto. Sin embargo sus bajas propiedades biomecánicas limita sus usos (88).

Cementos de fosfato cálcico: Como el utilizado en nuestra tesis, son cementos ampliamente utilizados en investigación y cada día más en la práctica clínica por las propiedades que ofrecen:

Aplicabilidad/ Plasticidad/ Fácil manipulación/ Versatilidad (antibióticos)

El proceso por el cual se obtiene el cemento consta de dos fases principales, el fraguado y el endurecimiento. A partir de la mezcla de la pasta y el líquido se forma una masa inicial moldeable, que tras un proceso de fraguado da lugar a una pasta rígida que al endurecerse da lugar al cemento (89).

En los cementos de fosfato cálcico, en función del material que se forma tras el fraguado podemos diferenciar dos grandes grupos, los que dan lugar a hidroxiapatita o brushita.

Podemos distinguir una reabsorción pasiva, ya que no intervienen células, y que depende de las características del material y una reabsorción activa, en la que sí que están implicadas las células (osteoclastos y otras células inflamatorias). Independientemente de la actividad celular, los cementos de fosfato cálcico que tienen como producto la brushita poseen una velocidad de reabsorción mayor con respecto a los de hidroxiapatita.

Sin embargo se prefieren los cementos de Ha, ya que éste es un componente natural del hueso y sus propiedades mecánicas son superiores a los de brushita (90).

No sólo es importante la velocidad de reabsorción, sino también la integración y la sustitución progresiva del cemento por tejido óseo (osteotransducción), en el que el tamaño del poro y su interconexión, resulta un factor limitante (91)

3. Elección del tema

La osteoporosis se caracteriza por la fragilidad ósea y el riesgo incrementado de fracturas. La prevención y el tratamiento de la osteoporosis así como de sus consecuencias, las fracturas, son uno de los grandes retos de la Medicina en los próximos años. Para ilustrar su enorme importancia actual y futura, ahí van algunos datos. Afectará según diversas fuentes a unos 200 millones de mujeres en todo el mundo, de las que 75 millones son europeas, norteamericanas y japonesas. En todo el mundo la osteoporosis causa más de 8,9 millones de fracturas anualmente. La posibilidad de una fractura se incrementa con la edad, 1 de cada 3 mujeres y 1 de cada 5 hombres por encima de los 50 años, sufrirá al menos una fractura a lo largo de su vida. Se estima que en Europa, 179.000 hombres y 611.000 mujeres sufrirán una fractura de cadera cada año y que el coste total de las fracturas osteoporóticas, solo en Europa sea de unos 25.000 millones de euros. La estancia hospitalaria debido a fracturas osteoporóticas en mujeres mayores de 45 años, es mayor que en otras enfermedades como diabetes o cáncer de mama. Como demuestran estos datos las fracturas osteoporóticas significan un coste enorme para los Sistemas de Salud de cada país (92,93).

La esperanza de vida en Europa no deja de crecer, con una población cada vez más envejecida. Estas fracturas son una de las principales causas de morbilidad y mortalidad entre este sector de la población.

Fracturas como las de fémur, vertebrales o muñeca alteran profundamente la calidad de vida de los pacientes. Por ejemplo, la fractura vertebral osteoporótica supone un importante incremento de la morbilidad en el paciente anciano debido al dolor, limitación funcional, deformidad, pérdida de la autonomía.

Son innumerables las ocasiones en las que existe una pérdida de autonomía del paciente, en unas ocasiones por la propia debilidad del paciente normalmente añoso, pero en otras ocasiones impuesto por el cirujano, incluso en pacientes de edad media, por el riesgo elevado de un fracaso de la osteosíntesis debido a la mala calidad del hueso.

Este “miedo” por parte del cirujano está justificado por la bibliografía, ya que, los pacientes con fracturas osteoporóticas tiene un mayor índice de complicaciones, con tasas de no unión de hasta el 20%, fracasos de la osteosíntesis del hasta el 10% y tasas reintervención de hasta el 23% (5).

La ausencia de una fijación adecuada, parece estar detrás de estas complicaciones, a pesar de los avances en osteosíntesis que han aparecido en los últimos años, como las placas bloqueadas. Por ello es primordial el aportar soluciones a estos problemas de fijación, que si hoy son frecuentes, dentro de unos años con las estimaciones actuales de envejecimiento de la población, serán sin duda mucho más prevalentes.

La necesidad de encontrar materiales biocompatibles, que no sean tóxicos, con una alta aplicabilidad y un coste aceptable, ha impulsado el sector de los Biomateriales y la Ingeniería Tisular en los últimos años con un incremento del 12% anual a nivel mundial según datos de la Comunidad Europea (94).

Para intentar dar una respuesta a estos problemas de fijación en el hueso osteoporótico la ingeniería tisular puede aportar distintas soluciones. Una de ellas es la utilización de células precursoras mesenquimales, comúnmente conocidas como “células madre”. Se trata de células sin características de ningún tipo celular concreto, que se pueden transformar en el laboratorio hacia las células del órgano que se quieren reemplazar. Eso supone conocer todas las moléculas que intervienen en este proceso para poder recrearlo en el laboratorio. Es precisamente en este punto dónde está, hoy por hoy, uno de los grandes obstáculos para el uso de este tipo de células, ya que no se conocen bien estos procesos.

Debemos, por tanto dar soluciones tempranas a este enorme problema de salud, independientemente de que continuemos investigando en futuras alternativas.

Los cementos cálcicos (hidroxiapatita) son una realidad en el campo de la Traumatología y la Cirugía Ortopédica, sin embargo se trata de materiales osteoconductores exclusivamente y con unas propiedades mecánicas pobres, que contribuyen a mejorar la osteosíntesis pero que no constituyen una solución definitiva y de garantías. Pero si que podemos utilizarlos como base o andamio para aportar un material que induzca, dirija y promueva la formación de hueso, como la fibronectina.

En el presente trabajo hemos estudiado las características de este biomaterial en un modelo animal osteoporótico con el fin de reducir los tiempos de consolidación de las fracturas, y con ello permitir un acortamiento del proceso de inmovilización reduciendo la morbilidad de éstas.

Objetivos

Objetivo principal:

Analizar si la hidroxiapatita combinada con fibronectina mejora la estructura ósea en un hueso osteoporótico, a través de un análisis por imagen e histológico.

Con nuestro estudio queremos probar si este material, además de ser osteoconductor y osteoinductor, cumple con los requisitos que debería tener el biomaterial ideal, que son:

- Biocompatibilidad
- No toxicidad de sus productos de degradación
- Aplicabilidad
- Compatibilidad con el material de osteosíntesis
- Coste

Objetivos secundarios:

- Valorar el conejo como modelo animal para estudiar los problemas de fijación en hueso osteoporótico.

Para valorar los problemas de consolidación y fijación en el hueso osteoporótico se han utilizado animales de pequeño tamaño como ratas y de mayor tamaño como el perro o el cerdo. Sin embargo existen pocos estudios que utilicen el conejo como modelo experimental.

- Valorar la fiabilidad del protocolo de osteoporosis

Con el fin de tener un modelo que se asemeje lo más posible al hueso humano osteoporótico, existen distintos protocolos para inducir osteoporosis en el modelo animal. En esta tesis evaluamos un protocolo que utiliza sólo corticoides sin realizar ooforectomía, reduciendo la morbilidad animal.

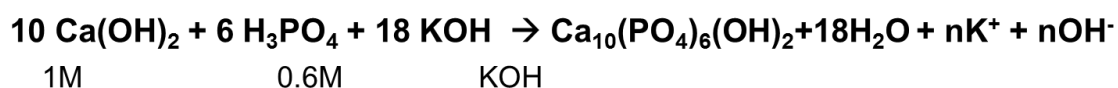
- Necesidad o no de histología tras el análisis por imagen con micro-CT.

4. Material y método

4.1 SINTESIS DEL MATERIAL

Síntesis de hidroxiapatita

Las síntesis de las distintas muestras se llevaron a cabo por la ruta de la Vía Húmeda. La hidroxiapatita se preparó mediante la reacción de una solución 1 M de $\text{Ca}(\text{OH})_2$, con una solución 0.6M de H_3PO_4 a pH constante. El ajuste del pH se realizó mediante la adición de cantidades adecuadas de KOH (1M) durante el proceso de precipitación. Se utilizaron 1000 ml de cada uno de los reactivos. Una vez optimizadas las condiciones de síntesis se mantuvieron constantes para todas las reacciones.



El control de las condiciones de síntesis fue posible gracias a la utilización de un equipo “Titrand” mostrado en la figura 4.1.

Se prepararon los reactivos con agua desionizada y se introdujeron en los dosinos del equipo “Titrand”. Se determinaron las condiciones de temperatura y velocidad de agitación en 38 °C y 100 rpm. Con el programa utilizado, se fijaron las velocidades de adicción de cada uno de los reactivos a 4 ml/min y se mantuvo el pH dentro de los valores previamente fijados 9,2-9,4.

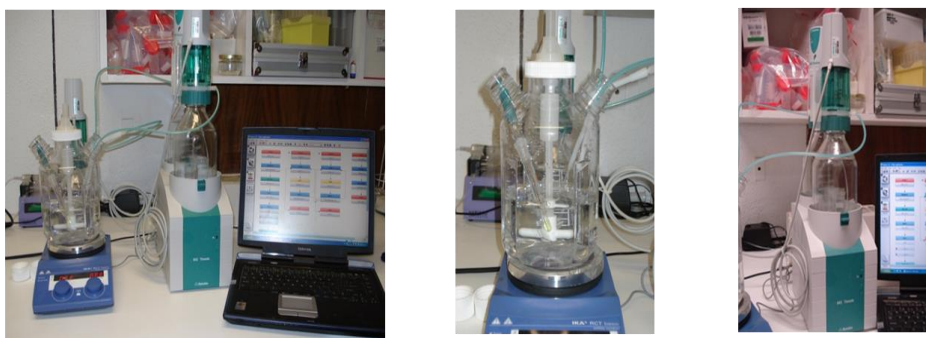


Fig.4.1. Esquema e imágenes del equipo Titrando utilizado para controlar los parámetros de síntesis.

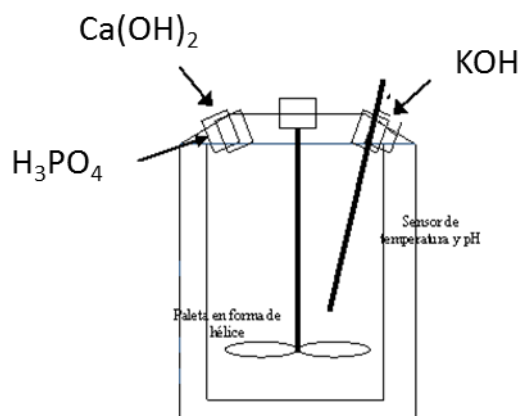


Fig. 4.2. Esquema del reactor utilizado para la síntesis.

Un vez finalizada la adición, se envejeció el producto durante 24 horas, controlando el pH mediante la adición de KOH en el rango anteriormente fijado. Pasadas las 24 horas, se elimina todo el solvente mediante decantación o centrifugación. Se introduce el producto obtenido en el reactor con agua desionizada y deja 48 horas en agitación, con el fin de eliminar los productos no deseados que pudieran quedar en la solución.

Pasadas las 48 horas, se elimina todo el solvente mediante centrifugación. El producto se congela a -80°C y se liofiliza. Se obtiene un polvo blanco seco. Parte del cual es calcinado a 900°C durante dos horas. Todas las muestras obtenidas son molidas durante 2 horas con el fin de desaglomerar las partículas y son almacenadas en seco para su posterior uso.

Adsorción experimental de fibronectina

La adsorción de las proteínas fue medida con un UV/ Vis Espectrometro Lambda 16. Las soluciones se prepararon mezclando 10mg de las muestras con 1,5ml de las diferentes proteínas disueltas en PBS. *Buffer* a pH 7 a diferentes concentraciones (0.1, 0.2, 0.5

mg/ml) en un Eppendorf cónico de polietileno de 2ml y con una cantidad total de proteína de 150, 300, 750 ug. La mezcla se mantuvo a 37 C durante 24h.

El componente, para la investigación por espectroscopia Raman, se recuperó por centrifugación y congelación. Con la solución sobrenadante se ensayó el contenido de proteína por espectroscopia UV, a 265 nm el fibrinógeno y la fibronectina a 203 nm. La cantidad de proteína adsorbida se calcula a partir de la diferencia entre las concentraciones de la solución inicial y el sobrenadante. Todas las mediciones se realizaron por triplicado. La unión a proteínas se estudió mediante espectroscopia Raman in a Renishawin Via-Reflex Microscopio Raman con una corte laser 785 nm, un grating ratio 1200l/mm (633/780) y una cámara CCD Renishaw detector con una potencia láser del 100% para la exposición / línea de 10,00, a una distancia de 30 mm. Finalmente la dosis de fibronectina fue 3,6 mg en 7,2 mL de PBS para una concentración de 0,5 mg/mL

Elección de la muestra definitiva

Se estudiaron las interacciones que se producen entre hidroxiapatitas con distintas características superficiales (tamaño de cristal, superficie específica y tamaño de partícula) con cuatro proteínas, a distintas concentraciones. El análisis de adsorción mediante espectroscopia UV/vis nos da información cuantitativa. La microbalanza de cuarzo da además la conformación que adquieren estas proteínas. Se realizaron ambas mediciones para cada una de las proteínas estudiadas (Fibrinógeno, Fibronectina, Colágeno, Albúmina).

Cada proteína interacciona con el material estudiado de manera diferente. No existe ningún único parámetro que estudiado por separado puede predecir el comportamiento de un material dentro del organismo. Para poder aproximarnos a una predicción razonable, es necesario hacer un estudio combinado de los parámetros superficiales del material, además del tipo de respuesta que esperamos por parte del cuerpo.

Se seleccionó una de las cuatro hidroxiapatitas sintéticas; aquella que como se explica a continuación reúne las características mas apropiadas para ser utilizada en la preparación de andamios. La hidroxiapatita de mayor potencial puede ser la OHAp-aa.

Cuyas características son:

SSA: 34(2) (m²/g) / Tamaño de cristal: 858 / Tamaño de partícula: 2.6

Y cuyos resultados en adsorción de proteínas son:

Tabla 4.1. Resultados obtenidos de las medidas de UV/vis para la muestra OHAp-aa

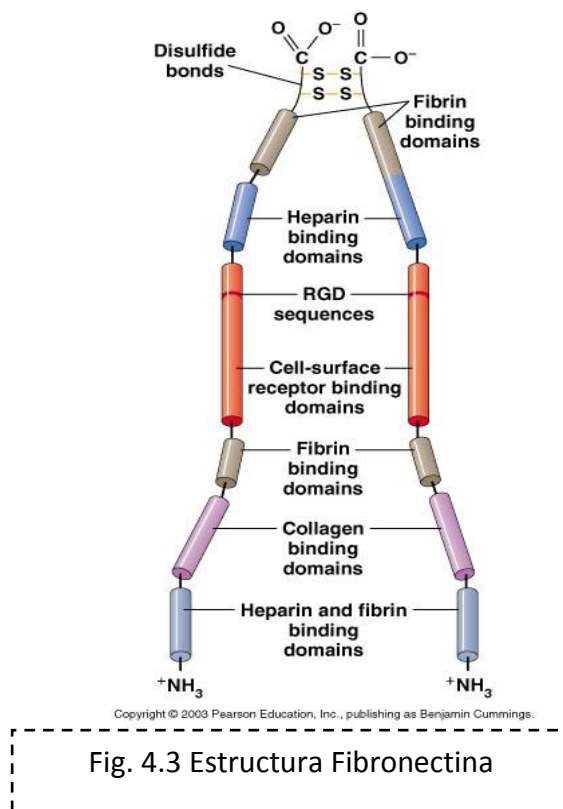
UV	100 µg/ml	200 µg/ml	500 µg/ml
Fibrinógeno	159(8)	197(9)	429 (19)
fibronectina	150(6)	277(10)	444(11)
Colágeno	96(2)	210(4)	635(8)
Albúmina	75(2)	107(4)	544(4)

Tabla 4.2. Resultados obtenidos con la microbalanza para la muestra OHAp-aa

MICROBALANZA	100µg/ml	200 µg/ml	Datos
Fibrinógeno	1001(7)	1146(8)	Conformación End-on
fibronectina	278(2)	529(4)	Conformación End-on
Colágeno	587(12)	1652(41)	d _{ad} 100: 5.5(0.1) nm d _{ad} 200: 12(0.3) nm
Albúmina	312(7)	375(9)	d _{ad} 100: 6(0.1)nm d _{ad} 200: 6(0.1)nm

La elección se realizó en base a los resultados obtenidos en el estudio de adsorción de proteínas con la microbalanza. La muestra OHAp-aa, es la que presenta la mayor adsorción de fibrinógeno, y que además en todas las concentraciones estudiadas se adsorbe en conformación end-on. En las medidas de adsorción de fibronectina, se observa, que OHAp-aa es también la que mas cantidad adsorbe, adquiriendo la fibronectina la conformación end-on. La fibronectina es la proteína, de las estudiadas, la mas especializada en la regeneración ósea. La albúmina y el colágeno también se adsorben en cantidades altas sobre OHAp-aa aunque no sea la muestra que mas adsorbe (95). La respuesta previsible si este material entra en contacto con un tejido receptor, sería la adsorción de altas cantidades de proteínas. El fibrinógeno se adsorberá en conformación end-on. En esta conformación el fibrinogeno tiene el

dominio proinflamatorio desactivado pero el dominio RGD libre, lo que favorecerá la adhesión de células osteogénicas.



Además, la fibronectina también podrá adsorberse en conformación end-on que es su conformación activa e incluso sustituir al fibrinógeno de acuerdo con el efecto *Vroman*. Éste describe como unas proteínas desplazan a otras sobre la superficie de los materiales debido a distintos parámetros como son el peso molecular, la carga iónica, etc. En el caso de la fibronectina y el fibrinógeno, cabría esperar que la fibronectina (500kDa) sustituya al fibrinógeno (400kDa), debido a su mayor peso molecular. Además, el colágeno y la albúmina se absorberían en altas cantidades pero sin llegar a formar una capa demasiado rígida que pudiera limitar la entrada de otras biomoléculas. Por tanto, el andamio utilizado fue la muestra OHAp-aa.

4.2 ELECCIÓN DEL ANIMAL

Existen varios modelos animales utilizados para investigar la patogenia de la Osteoporosis y permitir el desarrollo de nuevas terapias. Sin embargo no existen modelos animales que se adecuen a los requerimientos necesarios para el estudio de la fractura osteoporótica. Los aspectos de mayor interés son la fragilidad ósea, la fijación y la consolidación (96).

Seleccionar un modelo experimental adecuado implica consideraciones como:

- Analogía entre el modelo a utilizar y el sistema a investigar
- Homogeneidad genética del organismo animal, para garantizar la reproducibilidad de los resultados.
- Aspectos de disponibilidad, costo y facilidad de manipulación experimental.
- Aspectos ecológicos, derivados del uso de especies animales en investigación y el impacto que ello representa sobre el medio ambiente.
- Aspectos éticos relacionados con el uso de animales, que impliquen el uso de la mínima cantidad posible. Además, garantizar el mínimo de sufrimiento.

Teniendo en cuenta todas estas premisas y partiendo de que en nuestro modelo deseamos conocer la eficacia de la fijación del implante en un hueso osteoporótico, el conejo es un modelo adecuado.

Tiene un sistema haversiano en el hueso trabecular semejante al humano. Su recambio óseo entre 2 y 3 veces más rápido, permite analizar cambios importantes en tiempos

cortos. Aunque el modelo osteoporótico en rata es más conocido, su menor tamaño hace que la cirugía sea más dificultosa. Además la rata tiene una separación entre trabéculas muy pequeña, lo que no la hace apta para valorar los efectos de cementos inyectables.

Aunque los animales grandes como el perro y la oveja han demostrado ser superiores a los animales más pequeños, por su semejanza en cuanto a grosor y separación trabecular, presentan el problema del coste y la estabulación.

En este estudio se utilizaron 42 conejos hembra ex reproductoras de unos 8 meses de edad y de 5kg de peso (+/- 350g) de raza “Giant White New Zealand”.



Fig. 4.4 Conejo Gigante Nueva Zelanda.

En el cuidado, experimentación y sacrificio de los animales se siguieron la Propuesta Europea (Junio de 2010) de modificación de la Directiva Europea de 1986 (86/609/CEE) y la Ley 32/2007 del 7 de Noviembre (B.O.E. nº 268, 8 de noviembre de 2007, pág. 45914-45920).

4.3 PROTOCOLO DE OSTEOPOROSIS

Con el fin de conseguir unas características del hueso del animal, lo más parecidas al hueso osteoporótico (alteración de la microestructura y disminución de la masa ósea), se decidió utilizar un Protocolo de osteoporosis en conejos, siguiendo la escasa literatura existente en este animal.

Según el trabajo de Liu et al (97), la realización de una ooforectomía del animal junto con el tratamiento con metilprednisona durante 8 semanas, consigue una reducción de la densidad mineral ósea de hasta el 15% a las 6 semanas post cirugía (fémur distal) y de hasta el 36% a las 10 semanas post cirugía (vértebra lumbar). En estos protocolos también consiguen una disminución del grosor y aumento de la separación trabecular junto con una disminución de la densidad mineral ósea con el tratamiento con metilprednisona (1mg/kg/día) sin ooforectomía, aunque en menor medida.

Sin embargo el trabajo referente en la literatura de modelos osteoporóticos en conejos, es el desarrollado por Castañeda et al (98), en el que con dosis de 1,5mg/kg/día durante 4 semanas de metilprednisona consigue una importante reducción de la densidad mineral ósea.

Para ello y debido a la inexperiencia en el manejo de estos animales, se decidió realizar una prueba en 3 de ellos, con la autorización del Comité Ético, antes de realizar el estudio experimental definitivo. Con el fin de conseguir unas características lo más cercanas a un hueso osteoporótico, se optó por la ooforectomía+metilprednisona.

Después de un periodo de adaptación de los conejos de 48h, se realizó la ooforectomía, mediante laparotomía media, premedicación mediante inyección intramuscular de xylazina (Rompuns 2%, Bayer, France) y ketamina (Imalgenes 1000, Merial, France) y bajo anestesia general con sevoflurano. Dos semanas después de la intervención comenzó el tratamiento con metilprednisona a 1mg/kg/día diluida en salino 0,9%. Los conejos se pesaban semanalmente y la dosis de metilprednisona se administraba vía intramuscular durante 4 semanas.

De los 3 animales que se utilizaron, sólo uno de ellos completó el protocolo. Uno de ellos falleció a la semana, sin que se pudiera determinar la causa y el segundo lo hizo a las 4 semanas de la intervención por una obstrucción intestinal causada por una brida intestinal. Debido a la importante morbilidad que suponía el procedimiento de la ooforectomía, se optó por un protocolo en el que sólo se utilizase la metilprednisona, ya que aunque el grado de osteoporosis es menor, también se observa una disminución de la densidad mineral y una alteración de la microestructura.

Protocolo definitivo: Tras 48h de aclimatación a las instalaciones, y tras pesar los ejemplares, se les administró una dosis de 1,5mg/kg/día vía intramuscular durante 4 semanas. La metilprednisona se diluyó en salino 0,9%. Posteriormente se les mantuvo otras 2 semanas (6 en total) sin administrarles corticoide, previo a la cirugía.

Con dicho protocolo sólo hubo dos muertes del total de los 42 conejos. Uno de ellos sufrió una fractura abierta en la tibia a las 5 semanas y hubo que sacrificarlo y otro al finalizar el protocolo, sin que se pudiera determinar la causa del fallecimiento.

4.4 INSTALACIONES

El animalario se encuentra en el ala este de la planta baja del edificio de Docencia e Investigación. Esta situación le confiere aislamiento del resto del Complejo Residencial del Hospital “12 de Octubre” de Madrid, así como un eficaz control sobre personas no autorizadas, siendo las entradas de material y personas independientes y propias.

El mantenimiento de las instalaciones está encomendado al Servicio Técnico integrado en la plantilla orgánica del Hospital y, en casos especiales, a empresas especializadas ajenas al mismo.

Los locales de alojamiento están revestidos por pinturas plásticas en techos y paredes, así como suelos antideslizantes impermeables en PVC con juntas soldadas que permiten limpiezas regulares con productos adecuados. Las salas para animales de granja, principalmente porcino, están acabadas en cementos tratados de alta resistencia, con inclinación del suelo hacia los sumideros cubiertos existentes para facilitar la limpieza. Las puertas con acabado en acero inoxidable y tensor de cierre poseen juntas de estanqueidad perimetral y óculo con contraventana también en acero.

Las ventanas están protegidas con telas metálicas de malla fina para evitar el paso de animales y, principalmente, de insectos.

El número de habitaciones disponibles permiten alojar separadamente las distintas especies que habitualmente se emplean (ratas, ratones, conejos y cerdos), y destinar una de ellas para establecer cuarentenas en animales de nueva recepción u observaciones especiales.

El **Área quirúrgica** cumple con los requerimientos de la normativa vigente. Está separada del estabulario, cuenta con vestuarios de doble acceso, un antequirófano común y un amplio quirófano preparado con dos dobles tomas de gases (oxígeno, protóxido, aire medicinal y aspiración centralizada) para dos mesas, preinstalación de brazo quirúrgico, equipos anestésicos y respiradores, pulsioxímetro, bombas de infusión, monitores, bisturí eléctrico, medidor de flujos con sondas y otros dispositivos quirúrgicos o anestésicos, respiradores para roedores, cámara de eutanasia por CO₂, rayos X, placa caliente y caliente-fría, *rotarod*..... ; un almacén de quirófano; zona para lavado y limpieza (baño de ultrasonidos); y un vertedero.



Fig. 4.5 Quirófano
experimental

Dentro de los locales de servicio existe un almacén específico de comida y cama para los animales (pienso y viruta).

La limpieza de utensilios, jaulas, rejillas y biberones, se efectúa en una zona específica y equipada con una máquina de lavado. Una vez limpio el material se guarda en una dependencia contigua. Para la esterilización dispone de un autoclave para líquidos por presión, y otro por presión y vacío.

Los cadáveres de animales muertos o sacrificados son congelados hasta su retirada por parte del Servicio Municipal de recogida de animales muertos.

Condiciones ambientales.

El tratamiento del aire se realiza con climatizadores y cajas terminales controlados desde una central informatizada que permite regular la temperatura y humedad de forma diferenciada, con renovaciones según locales y áreas, y presiones diferenciales según locales (hasta 10 pascales en quirófanos y sobrepresión en la zona de barrera del animalario). La filtración del aire tiene dos niveles (filtros tipo G-4 y F-9) y un nivel en la salida del aire en el área específica del animalario, en quirófanos además hay un tercer nivel (F-6) y un filtro absoluto HEPA H-14 en los difusores.

Existen reguladores luminosos para ciclos día-noche con controladores individuales en cuadro eléctrico específico.

El aislamiento acústico dado la localización y construcción es suficiente para no ser causa de molestia en los animales alojados.

Cuidados.

Las condiciones de salud, cuidados y alojamientos son verificados por un veterinario con formación posgraduada Máster en experimentación y protección de los animales de laboratorio, (Dra. Montserrat Grau Sanz).

Los animales nuevos se reciben en fecha pactada para su recepción, inspección y verificación del estado de salud, establecimiento de cuarentenas y aclimatación antes de ser utilizados en experimentos.

Para garantizar la calidad zoosanitaria, la procedencia de animales es siempre de Centros de cría y suministradores registrados.

Las jaulas para conejos son de acero inoxidable con las siguientes características:

- Bandejas de recogida de excrementos en acero inoxidable.
- Comederos –tolvas de acero inoxidable AISI 304.
- Soportes para biberón completos con biberón de 750 ml de policarbonato, aro de silicona y tetina de acero inoxidable con cánula cierre a bola
- Dimensiones de las jaulas: 730 x 730 mm



Fig. 4.6 Jaula.

Los alimentos se proporcionan secos (piensos granulados) y específicos para cada especie con formulación adecuada, conocida y certificada. El agua procede de la red pública y como medida complementaria es acidificada ($\text{pH} \leq 3$) o esterilizada en autoclave.

Como cama se emplea viruta comercial de gran absorbencia y atóxica, se acompaña periódicamente de un análisis químico y biológico.

Aunque es infrecuente su empleo, existe una zona acotada exterior que posibilitaría el ejercicio de los animales en caso de largas estancias.

El personal asignado al animalario es estable y está entrenado en el manejo y cuidado de los animales, siendo su labor dirigida y supervisada por el veterinario encargado.

El programa de limpieza, uso de jabones, detergentes y productos desinfectantes, así como vacíos sanitarios activos consiguen un nivel de higiene satisfactorio.

Registro.

Datos del centro como centro usuario de animales de experimentación

Estabulario del Hospital Universitario 12 de Octubre. Nº de Registro ES280790001164

4.5 ANESTESIA

En la preparación anestésica de estos animales es importante realizar un examen clínico minucioso y familiarizarse con los parámetros fisiológicos normales en el conejo, ya que la mortalidad perianestésica en conejos es un 1,83% (Brodbelt, 2008), muy por encima de humanos (0,02-0,005%), u otro animales como perros (0,17%) o gatos (0,24%) (99). Para minimizar el estrés y reducir el riesgo de caídas y fracturas espinales y de huesos largos, el transporte de una sala a otra se realizó en un trasportín.

Protocolo anestésico

- **Sedación preanestésica**

La sedación preanestésica es beneficiosa, al reducir las dosis de anestésicos generales y minimizar el estrés. Se administró vía intramuscular

-Ketamina 25mg/kg

-Xylacina 4mg/kg

-Atropina 1mg

Una vez sedado se procede a la colocación de un catéter en la vena marginal de la oreja o la vena cefálica.

- **Inducción y Mantenimiento**

La inducción se realizó por vía inhalatoria, con Isoflorane 4%.

Se administró una dosis pre operatoria única de antibiótico, trimetropin/sulfametoxazol.

Al tratarse de un procedimiento corto (menos de 30 minutos) el mantenimiento se realizó con mascarilla administrando isoflorane 2% y gas fresco (oxígeno puro) a 1L/minuto

Los anestésicos inhalatorios se administraron a través de un circuito anestésico abierto.

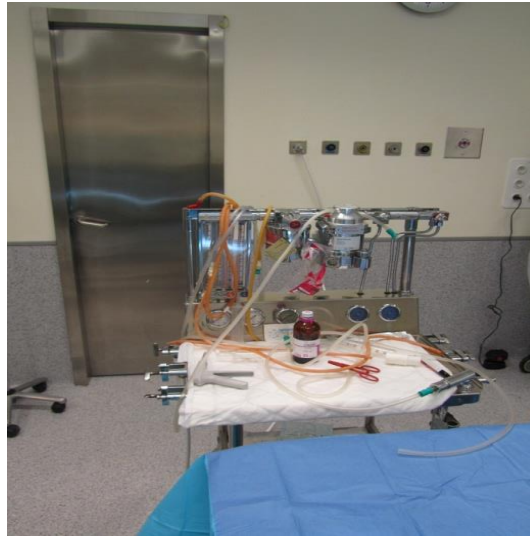


Fig. 4.7 Equipo de anestesia.

La **monitorización** básica de las variables fisiológicas consistió en la obtención de la frecuencia del pulso periférico y la frecuencia respiratoria, así como la evaluación de la calidad de los mismos, a través del pulsioxímetro colocado en la oreja, al tratarse de un animal poco pigmentado.

Para minimizar el dolor y el estrés postquirúrgico y conseguir una rápida vuelta a la actividad normal del animal, se administró buprenorfina (0,01mg/kg IV) y carprofeno (4mg/kg IV). También se valoraron otras variables como la temperatura o la ingesta.

4.6 PROTOCOLO QUIRURGICO

Cuarenta y dos conejos blancos gigantes de Nueva Zelanda se utilizaron para el estudio. La zona de implantación del tornillo y el cemento fue el cóndilo lateral del fémur de ambas patas traseras. En ambos fémures se implantó el tornillo, en uno de ellos con el material y en el otro sin él, que hacía de control.

La elección del fémur derecho o izquierdo como control o muestra se hizo de manera aleatoria.

El implante es un tornillo (acero, estándar AO) de esponjosa de 4mm de diámetro y 12 mm de longitud (certificado: CE & ISO 13485:2003; YB orthopedic implant, Jiangsu, China)

Antes del inicio de la cirugía y con el animal ya anestesiado se procedía a la depilación de la zona



Fig. 4.8 Depilado zona quirúrgica.



Fig. 4.9 Inducción anestésica

El abordaje se realizó mediante Una incisión en la piel en el lado lateral del fémur distal. El plano muscular se separó mediante disección roma para tener acceso al fémur.

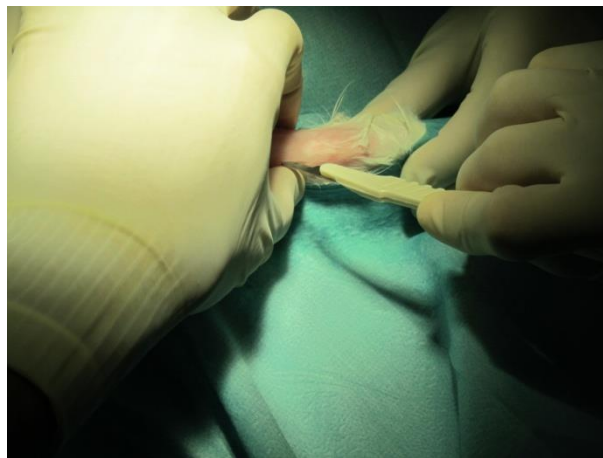


Fig. 4.10 Incisión piel.

El punto de entrada para la perforación se determinó utilizando como referencia el ligamento colateral lateral, unos 5 mm proximales a éste.

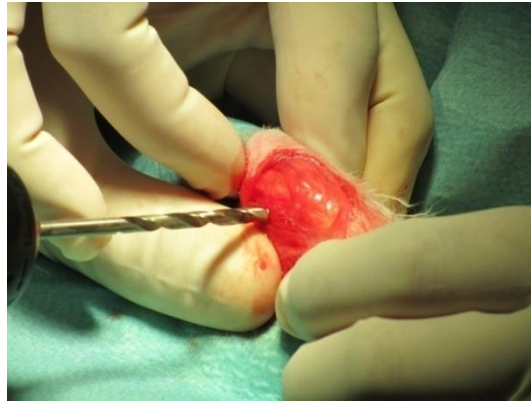


Fig. 4.11 Brocado fémur

La broca de 3,2 mm se colocó perpendicular a la superficie del hueso, con cuidado de no perforar la segunda cortical. El impacto térmico de la perforación se minimizó con abundante irrigación con suero salino.



Fig. 4.12 Cóndilo perforado.

El material que se conservaba a 4°C con hielo seco, y se preparaba cuando comenzaba el brocado del fémur del animal

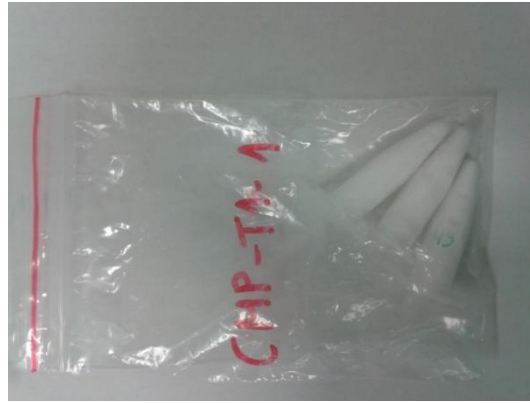


Fig. 4.13 Detalle muestras.

En uno de los fémures elegido de manera aleatoria, se implantaba el tornillo y en el contralateral el material y posteriormente el tornillo.



Fig. 4.14 Introducción del material.



Fig. 4.15 Colocación del tornillo.



Fig. 4.16 Defecto con el tornillo.

Después de la inserción del tornillo, se suturó el subcutáneo con hilo reabsorbible (Vycril 3.0) y piel con monofilamento no reabsorbible (Ethilon-3.0).

En el postoperatorio inmediato comenzó el protocolo de tratamiento administrando analgésico buprenorfina (0,05 mg/kg IM) y antiinflamatorio carprofeno (4mg/kg IM) durante 7 días.

Se realizó un seguimiento diario post quirúrgico valorando signos de infección, alteraciones del comportamiento, cojera...

4.7 GRUPOS EXPERIMENTALES

Se formaron 2 grupos experimentales (Hidroxiapatita e Hidroxiapatita + Proteína) y el grupo Control.

La elección del fémur derecho o izquierdo para la Hidroxiapatita /Hidroxiapatita + Proteína se hizo de manera aleatoria en cada individuo, utilizando el fémur contralateral como control.

Los animales se identificaban mediante un número que presentaban en la cara interna de ambas orejas.

Se analizaron 3 tiempos 24 horas, 48 horas y 5 días, cada individuo se incluyó en cada grupo de manera aleatoria.

El número total de implantes estudiados fue de 76 (38 animales). Diecinueve del grupo de Hidroxiapatita con sus correspondientes controles, diecinueve de Hidroxiapatita + Proteína con sus correspondientes controles.

Hubo 4 pérdidas, dos se produjeron durante la realización del protocolo de osteoporosis (uno sufrió una fractura abierta de tibia y fue sacrificado y otro murió de causa desconocida). Otras dos se produjeron durante el seguimiento de las muestras, uno en el postoperatorio (primeras 24h) y otro a las 48 horas, sin poder determinar las causas.

Una vez finalizado el periodo de estudio, los animales fueron sacrificados, el método eutanásico que se utilizó consistió en una inyección intravenosa de tiobarbital (Tiopental) por vía intravenosa.



Fig. 4.17 Método de eutanasia.

Posteriormente se procedió a la extracción en bloque, de los fémures en cada animal.



Fig. 4.18 Fémur con tornillo.

Una vez aislados los fémures, se realiza la limpieza de las partes blandas y se fijan en formol diluido con salino al 4%.

4.8 ANÁLISIS MICRO - CT

Hasta hace unos años la Histología era la técnica estándar para el análisis de la estructura del hueso cortical y trabecular. Aunque la Histología proporciona una información única en cuanto a las estructuras celulares y la dinámica de la remodelación ósea, presenta limitaciones en cuanto al análisis de la microestructura, ya que sólo puede hacerlo en dos dimensiones.

El micro CT consigue imágenes con una alta resolución en 3 dimensiones. Las ventajas de esta técnica son:

- Mediciones en 3 dimensiones del grosor y estructura trabecular, frente a las 2 dimensiones
- Mayor cantidad de muestra analizada
- Mediciones mucho más rápidas
- A diferencia de la histología, el análisis con el Micro CT no destruye las muestras, permitiendo un nuevo análisis o la realización de otras pruebas.

Por ellos se ha convertido en el “gold estándar” en el análisis de morfología ósea y la microestructura de animales pequeños (rata, ratón, conejo) ex vivo (100).

Características Micro-CT

El eXplore Locus Micro CT escáner está diseñado para obtener imágenes de animales de laboratorio pequeños y medianos, tales como ratas y conejos.

Apto para la investigación biomédica permite adquirir de forma no destructiva imágenes en 3-D, tanto in-vivo como in-vitro de los ejemplares.

El eXplore proporciona imágenes de todo el cuerpo del animal a una resolución de 45 o 90 μ m y de 27 μ m para muestras in vitro.

EL eXplore micro CT tiene una tecnología Conebeam CT que, a diferencia de TC convencional, permite obtener todo el volumen de una muestra en una sola rotación para formar la imagen, en lugar de trozo a trozo, siendo éste método mucho más rápido .

El sistema Conebeam CT proporciona una calidad de imagen excepcional, con tiempos de análisis cortos con una mejor relación “*noise-ratio*”.



Fig. 4.19 Micro- CT

La cabeza del tornillo se sujeta en una de vaina de sujeción, especialmente diseñada para garantizar la alineación del tornillo con el eje de barrido.

La vaina de sujeción se coloca entonces en el soporte de poliestireno de la in vivo mCT eXplore Locus SP (GE Healthcare). Cada muestra se analizó a 80kV/90mA, con filtro de

aluminio de 1 mm. El tamaño del pixel (resolución) fue de 0.017995 mm, la rotación fue de 360° con un ángulo de incremento de 0.5°, el tiempo de exposición fue de 1700 ms, y cada imagen se analizó de media 4 veces.

El “*phantom*” utilizado para la calibración, lo proporciona GE. Está compuesto por:

- Una burbuja llena de agua, de modo que el valor del agua se puede determinar.
- Un fragmento de hidroxiapatita, que tiene el coeficiente de atenuación del hueso.
- Un agujero, que puede ser utilizado para determinar el valor de la burbuja de aire.

El agua es perfectamente redonda, esto permite asegurarse que el centro de rotación es correcto.



Fig. 4.20 Detalle *Phantom*.

Después de la exploración, las muestras se colocaron en su respectivo tubo Falcon con formol. Al comienzo de cada sesión de exploración y después de cada cuatro muestras,

se realizó la corrección de los parámetros de exploración seleccionados para reducir la relación “*noise ratio*”, y asegurar una exposición constante de las imágenes, porque la fuente de rayos X puede fluctuar ligeramente con el tiempo. El conjunto de datos fue reconstruido con el software Micro View (GE Healthcare).

4.9 PROTOCOLO HISTOLÓGICO

El análisis histológico de las muestras se llevo a cabo por el Departamento de Histología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Salamanca.

Fijación:

Las muestras se fijan en formol salino al 10%. Las muestras, no descalcificadas, se vuelven a lavar con agua y se realiza un serrado macroscópico.

Deshidratación:

Las porciones óseas se introducen en recipientes, adecuadamente etiquetados, y se deshidratan empleando disoluciones de graduación creciente de etanol (70, 80, 90 y 95), permaneciendo 24 horas en cada una de las disoluciones, hasta llegar a etanol absoluto, donde permanecen dos días.

Inclusión:

La inclusión de las muestras óseas se realiza en metilmetacrilato en estado líquido durante 15 días a 4°C en agitación.

Componentes del metilmetacrilato:

- 800mL M-metacrilato (monómero estabilizado de hidroquinona).
- 160mL Nonifenol poliglicol-éter acetato (Plastoid N).
- 16mL dibutil-ftalato.
- 40gr peróxido de benzoilo (este catalizador se adiciona de inmediato).

Transcurridos los 15 días, se pasan a cilindros con bases de metilmetacrilato ya polimerizado. Se meten los tubos en la estufa a 32°C para su polimerización durante 5 y 6 días.

Obtenemos el bloque polimerizado con la muestra ósea, que debe ser cortado con una sierra de cinta, antes de realizarlos cortes definitivos.

Corte:

Para la realización del corte de la muestras se utilizó una sierra de diamante, 1-1280-160 IsoMet® Low Speed Saw de la casa BUEHLER dotada de micrómetro de precisión que permite utilizar hojas de corte de hasta 125 mm.

Tinción:

Preparación de la solución de Azul de Stevenel.

Solución A:

- Azul de metileno 1 g
- H₂O_d 75 mL.

Solución B:

- Permanganato potásico 1,5 g
- H₂O_d 75 mL.

Se mezclan las dos soluciones en un baño hirviendo hasta que el precipitado se disuelve completamente y se filtra. Se conserva durante varios meses a temperatura ambiente. En el momento del uso ya no es necesario volver a filtrar.

Preparación de la solución de picrofucsina de Van Gieson.

Solución A

- Fucsina ácida 1 g
- H₂O_d 100 mL.

Solución B

- Ácido pícrico a saturación.

En el momento de hacer la tinción se hace la siguiente mezcla: Se filtran 10 mL de la solución B y se añaden 5 gotas de la solución A. Agitar hasta homogeneizar.

- Sin desplastificar y sin pasar por los alcoholes.
- Calentar la solución de Azul de Stevenel (previamente preparada) a 60°C en baño de María.
- Calentar la solución de H₂O_d a 60 °C en baño de María.
- Sumergir la muestra en solución de Azul de Stevenel a 60°C durante 15 minutos.
- Aclarar con H₂O_d a 60° C durante 30 segundos.
- Introducir la muestra en la solución de picrofucsina de Van Gieson (previamente preparada) durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Deshidratar con alcohol de 100 ° durante 15 minutos.
- Ya podemos observar al microscopio..

5. Resultados

Los especímenes analizados en esta tesis fueron evaluados mediante análisis de imagen (Micro CT) y mediante análisis Histológico.

A continuación pasamos a detallar los resultados del análisis por imagen primero y posteriormente el análisis histológico de las muestras de cada grupo, Control, Material (OHA p) y Material + Proteína (OHAp- Fn).

5.1 RESULTADOS MICRO CT

En total se analizaron un total de 20 muestras, 5 controles, 6 de material (OHAp) y 9 de material + proteína (OHAp-Fn).

Las variables analizadas fueron:

BMD: Densidad mineral ósea

BVF: Porcentaje de hueso en el volumen total

TbTh: Grosor trabecular medido mediante técnica 3D

TbSp: Separación trabecular medido mediante técnica 3D

Y los estudios realizados:

5.1.1 Análisis de las muestras independiente del tiempo

5.1.2 Análisis de las muestras dependiente del tiempo

5.1.3 Análisis detallado de las muestras

- **Zona próxima al tornillo 1(derecha)**
- **Zona próxima al tornillo 2(izquierda)**
- **Zona inferior al tornillo**
- **Zona alejada del tornillo**

Ejemplo de los resultados obtenidos:

A continuación se muestra uno de los especímenes analizados. En la figura 5.1 se observa el tornillo implantado en el cóndilo femoral, con contacto con hueso trabecular. En las imágenes de la derecha se ven las distintas perspectivas y debajo la reconstrucción en 3D de la muestra analizada.

A continuación en la tabla 5.1 se recogen los parámetros numéricos obtenidos.

OHAp – Fn 24 (24h)

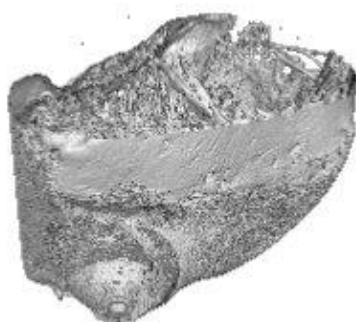
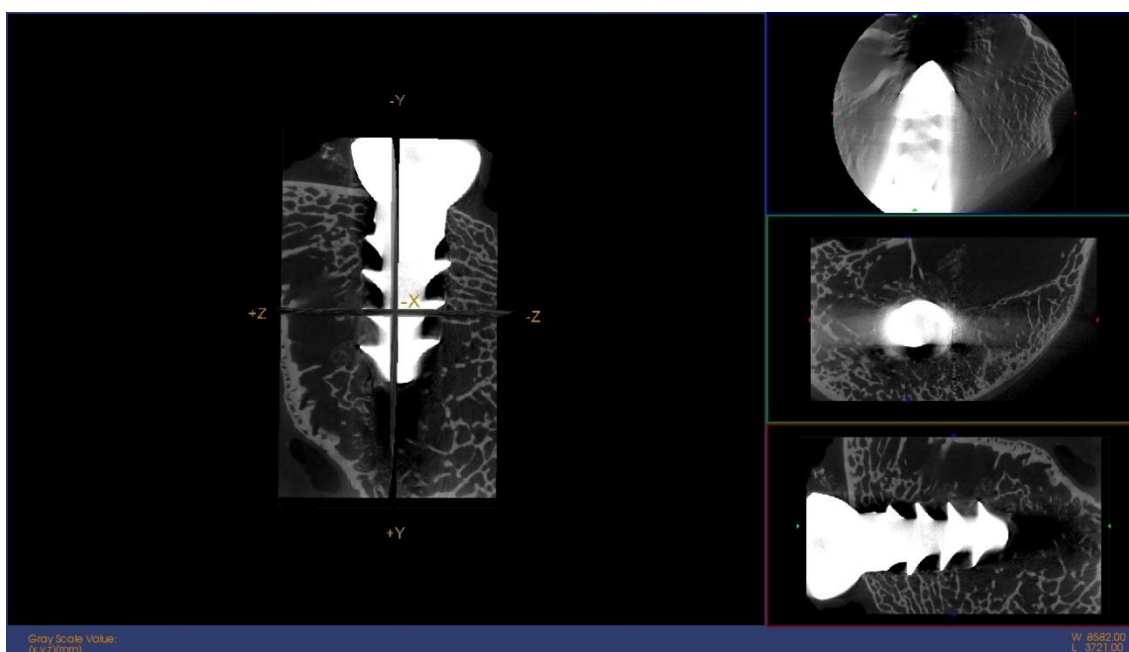


Figura 5.1 Imagen micro CT e imagen reconstrucción 3D. OHAp-Fn 24

BMD Resultados	
Media: 829.5269	Std Dev: 1265.7774
Volumen (mm³): 2215.3718	Volumen de Hueso (mm³): 631.6750
Voxels: 59789924	BMC (mg) 526.8136
BMD (mg/cc): 548.0128	TMC (mg): 445.7867
TMD (mg/cc): 705.7216	BVF: 0.2851
Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 16.32	Tb.Sp. 3D (pixels): 58.30
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0.544116	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0.8057

Tabla 5.1 Resultados OHAp-Fn 24

Resumen de los datos analizados**GRUPO CONTROL.**

24h		48h	5d
<u>BMD</u>	214.4613/256.2474/536.8503	330.6986	264.1548
<u>BVF</u>	0.38/0.311/0.242	0.2346	0.230
<u>TbTh</u>	0.376/0.393/0.331	0.483	0.391
<u>TbSp</u>	0.8401/0.9016/0.7128	0.5861	0.667

Tabla 5.2 Resumen datos grupo control

GRUPO OHAp.

24h		48h	5d
<u>BMD</u>	193,3838/403,4237	382,3343/234,1772	316,8156/212,246
<u>BVF</u>	0.3122/0.208	0.320/0.2391	0.2971/0.2548
<u>TbTh</u>	0.410/0.470	0.418/0.513	0.340/0.596
<u>TbSp</u>	0.8421/0.5833	0.9282/0.6851	0.8019/0.559

Tabla 5.3 Resumen datos grupo OHAp

GRUPO OHAp-Fn

24h	48h	5d
<u>BMD</u> 548,0128/376,7034/224,2024	208,7767/312,9163/344,3739	213,465/360,7170/356,1477
<u>BVF</u> 0.285/0.271/0.31	0.2468/0.204/0.224	0.35/0.251/0.201
<u>TbTh</u> 0.544/0.535/0.399	0.315/0.523/0.50	0.366/0.545/0.677
<u>TbSp</u> 0.6149/0.7534/0.8057	0.505/0.5979/0.7909	0.865/0.6008/0.4745

Tabla 5.4 Resumen datos grupo OHAp-Fn

5.1.1 Análisis de las muestras independiente del tiempo

Análisis estadístico

BMD.

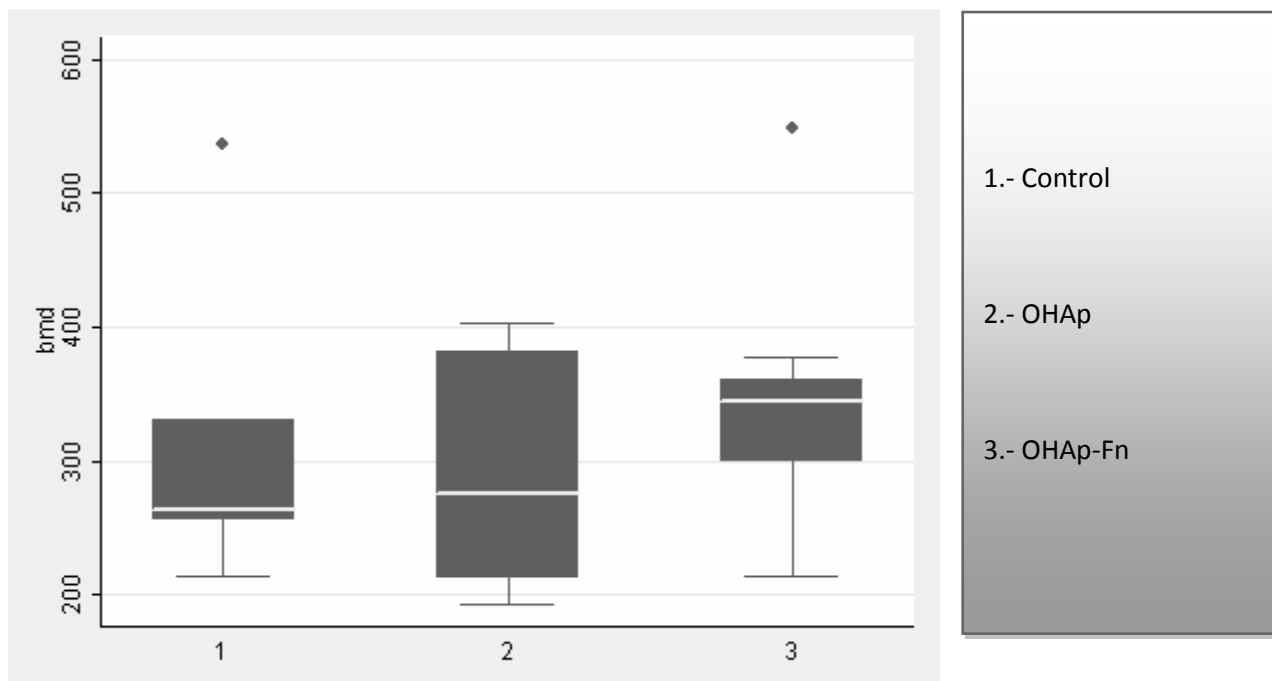


Gráfico 5.1. Análisis BMD; $p = 0.7081$ (Test no paramétrico Kruskall Wallis)

BVF

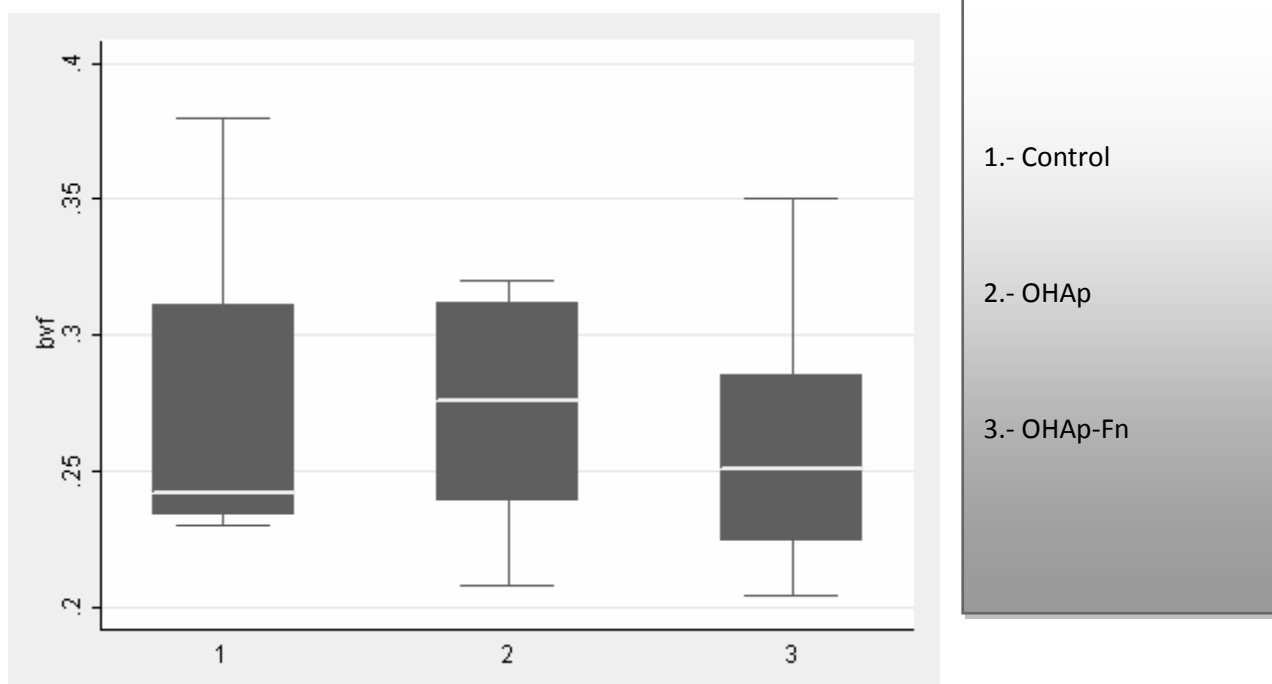


Gráfico 5.2. Análisis BVF; $p = 0.8039$ (Test no paramétrico Kruskall Wallis)

TbTh

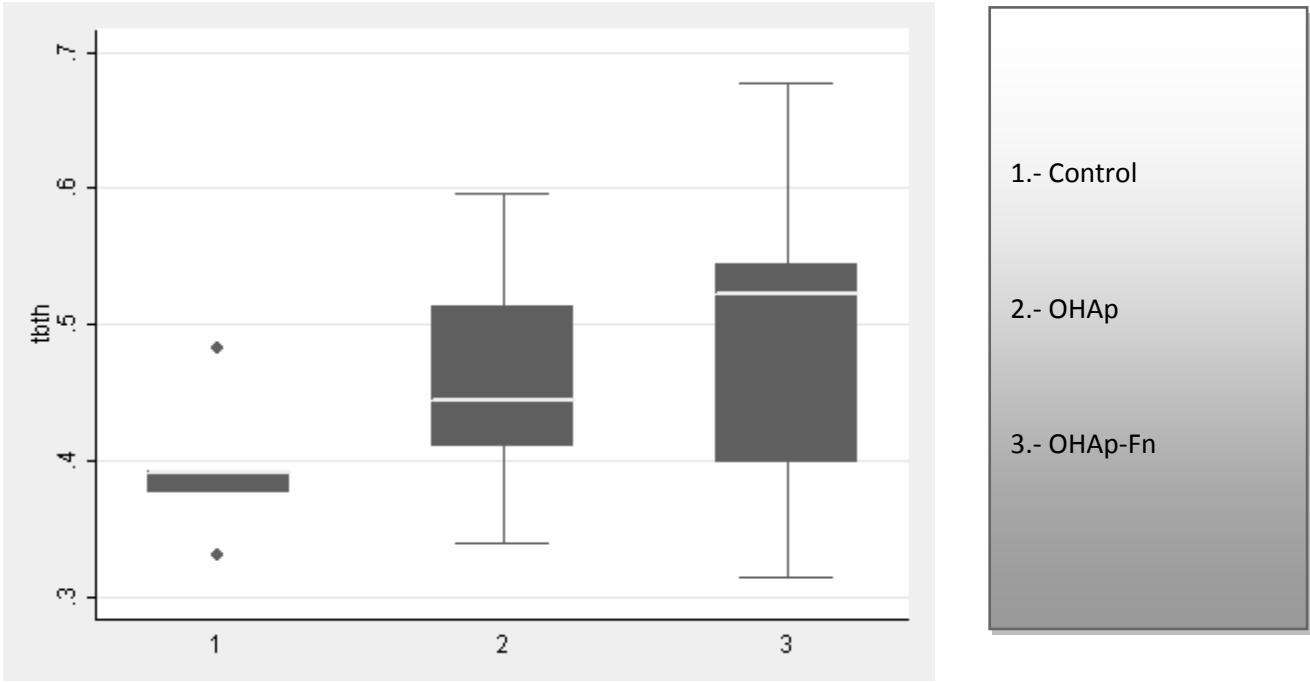


Gráfico 5.3. Análisis TbTh. $p = 0.1681$ (Test no paramétrico Kruskall Wallis)

TbSp.

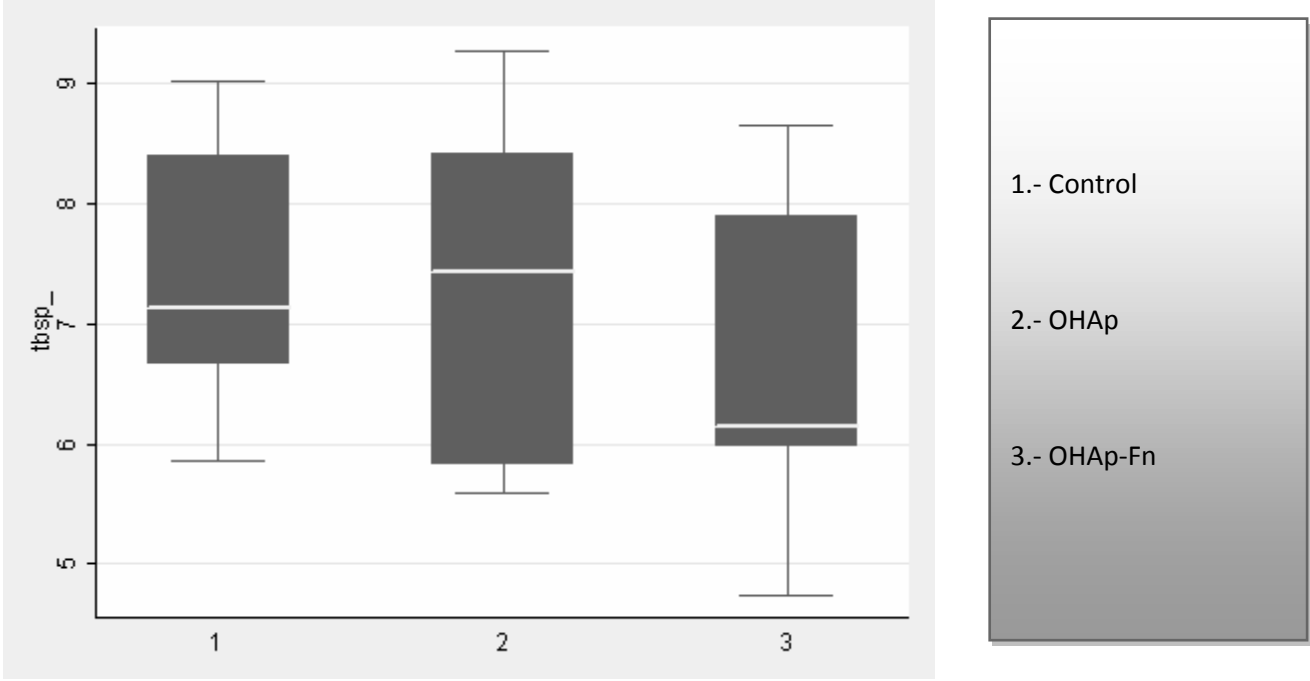


Gráfico 5.4; Análisis TbSp; $p = 0.6261$ (Test no paramétrico Kruskall Wallis)

RESUMEN ANÁLISIS INDEPENDIENTE DEL TIEMPO.

Para el análisis de las muestras se utilizó un test no paramétrico, test de Kruskal Wallis, al tener una muestra $n < 20$ y comparaciones múltiples.

El análisis de las muestras independiente del tiempo, no determina diferencias importantes para las variables BMD y BVF, siendo bastante parecidos los valores, aunque la mediana es ligeramente superior para la variable BMD en la muestra con proteína (OHAp-Fn).

Sin embargo observamos unas tendencias muy marcadas en cuanto a las dos variables que nos definen la microarquitectura del hueso trabecular, TbTh y TbSp. En la primera de ellas la significación es de $p=0,1681$, que a pesar de no tener significación estadística ($p < 0,05$) debido al bajo número de muestras analizadas es un resultado bastante representativo. La otra variable, el grosor trabecular también muestra una tendencia marcada a descender, con los valores más bajos para la muestra con OHAp-Fn con respecto a los controles.

5.1.2. Análisis de las muestras dependiente del tiempo (24h, 48h y 5días)

BMD.

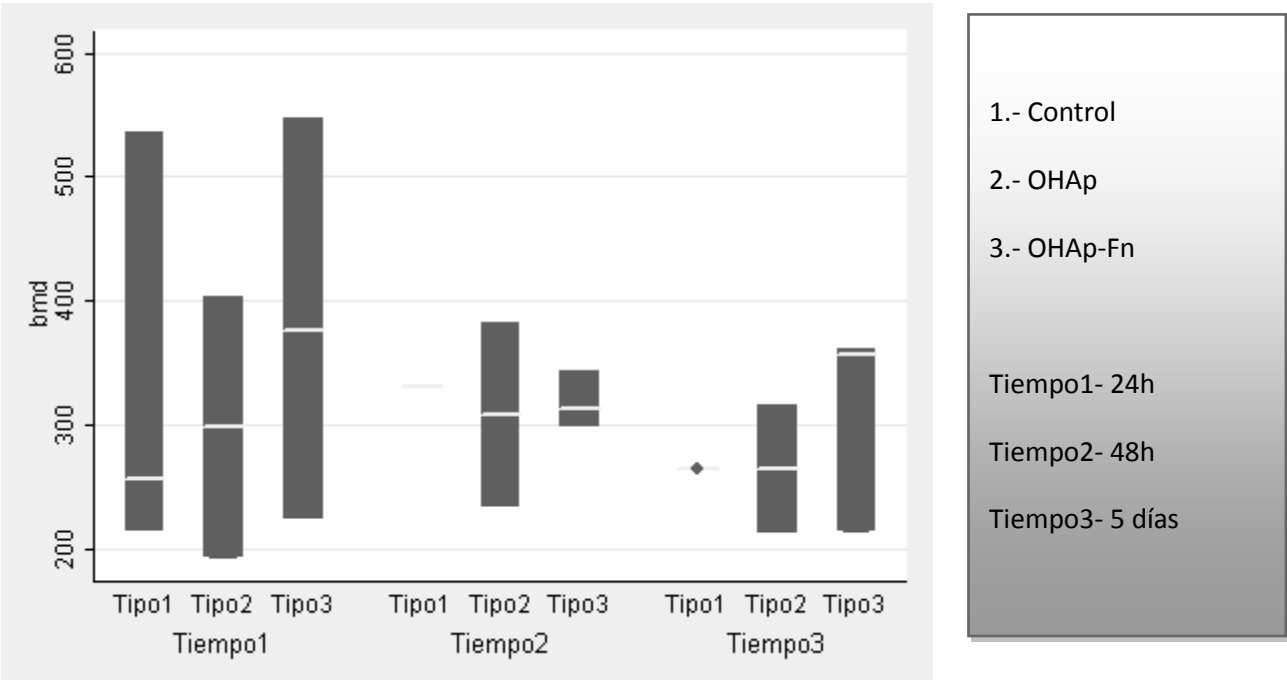


Gráfico 5.5. Análisis BMD dependiente del tiempo para las tres variables

BVF.

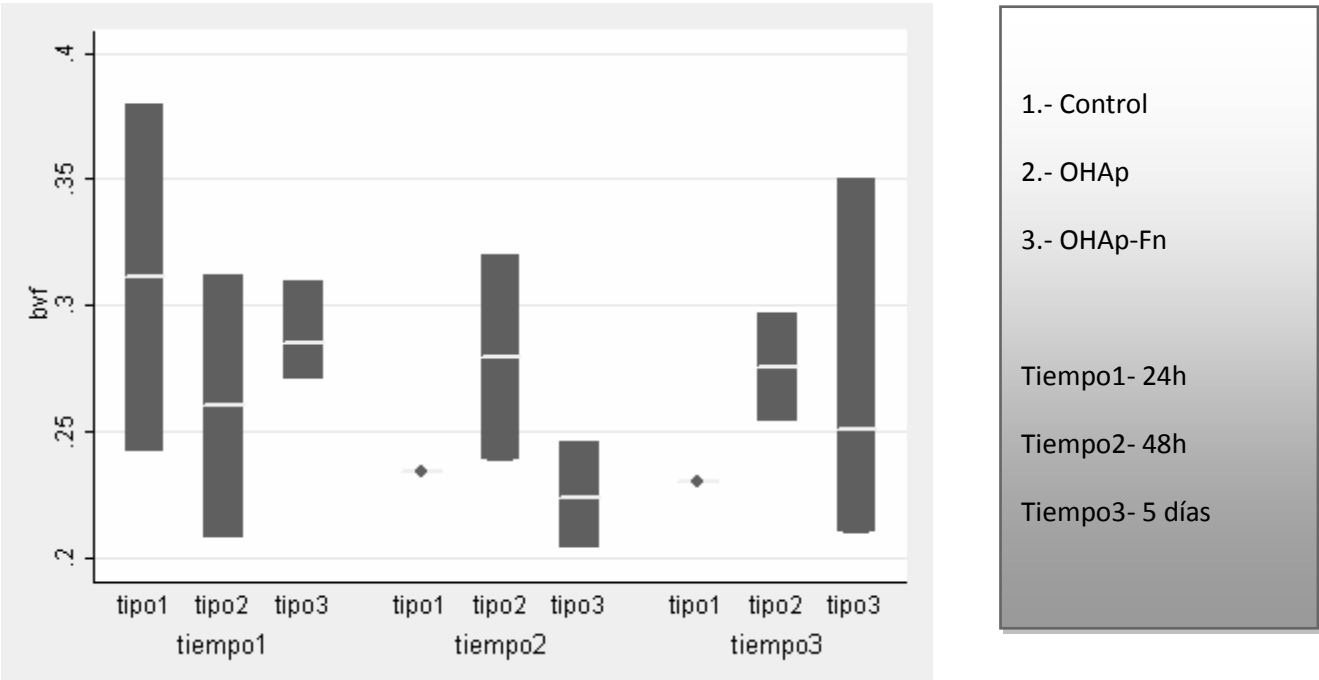


Gráfico 5.6. Análisis BVF dependiente del tiempo para las tres variables

TbTh.

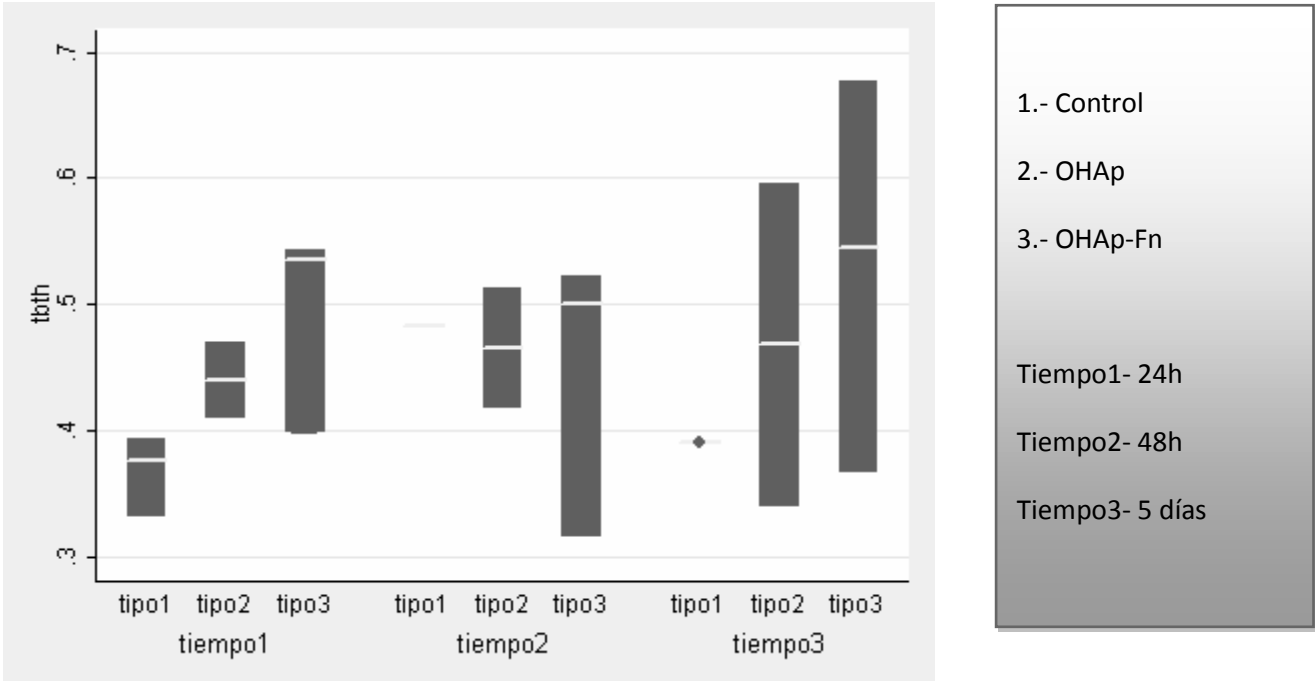


Gráfico 5.7. Análisis TbTh dependiente del tiempo para las tres variables

TbSp.

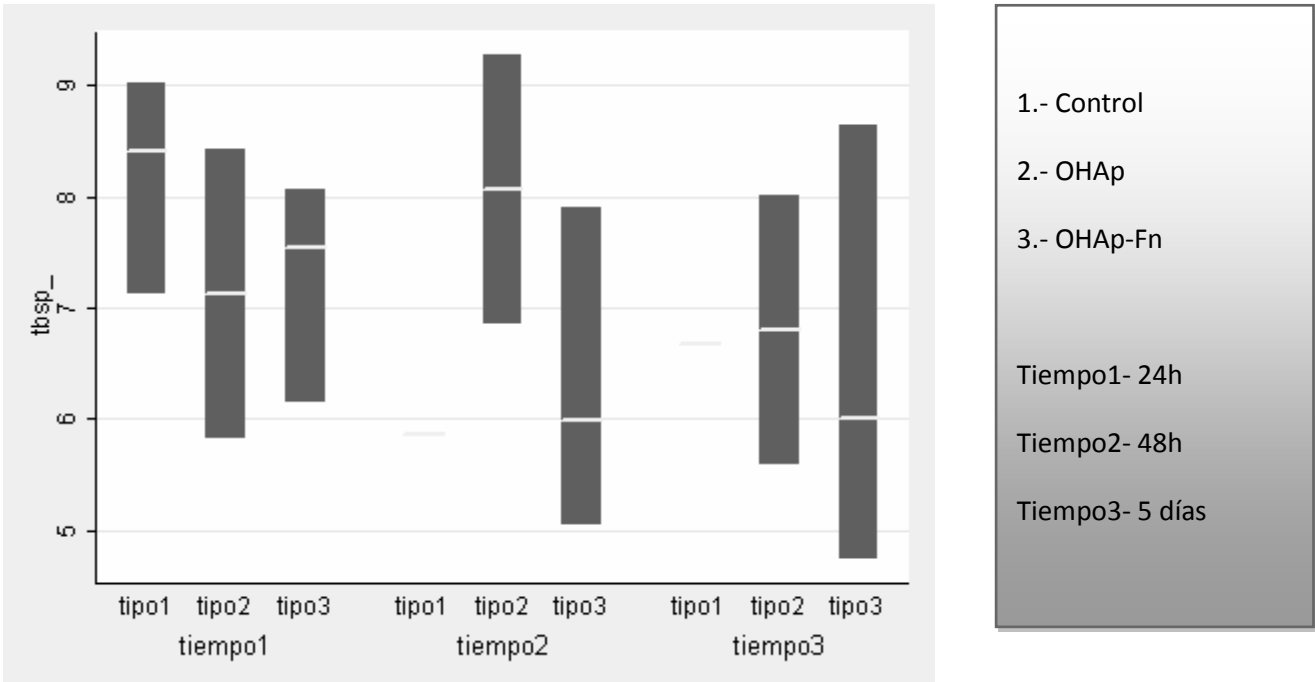


Gráfico 5.8. Análisis TbSp dependiente del tiempo para las tres variables

RESUMEN ANÁLISIS DEPENDIENTE DEL TIEMPO.

Para el análisis de las muestras en función del tiempo (24 horas, 48 horas y 5 días) también utilizamos el Test de Kruskal Wallis.

En este caso, nos centraremos en las muestras OHAp y OHAp-Fn, ya que en el caso de los controles sólo disponemos de una muestra en algunos tiempos.

La tendencia de la variable BMD para la muestra de HA es a descender hacia el 5 día, en el caso de la muestra OHAp-Fn su tendencia es descender a las 48 horas, sin embargo asciende a los 5 días, cambios parecidos a los que sufre la variable BVF para esta muestra. En cuanto a la variable BVF en la muestra OHAp, su valor permanece constante con el tiempo.

La variable TbTh en las muestras sin proteína, asciende a las 48h para mantenerse constante después, mientras que para las muestras OHAp-Fn desciende a las 48 horas, para ascender hasta situarse en un valor próximo al que tenía a las 24 horas.

Si observamos la variable TbSp su tendencia es aumentar su valor a las 48 horas en las muestras OHAp, para descender posteriormente a los 5 días. La tendencia de esta variable, en las OHAP-Fn, es descender a las 48 horas, permaneciendo este valor constante a los 5 días.

Ninguna de estas diferencias obtuvo significación estadística $p < 0,05$. Sin embargo las diferencias a las 24 horas para la variable TbTh entre los tres tipos de muestras es de $p = 0,07$, aunque estos valores próximos a la significación estadística no se mantienen en el resto de tiempos.

5.1.3. Análisis detallado de las muestras

A continuación se muestran distintos ejemplos de los especímenes analizados según el análisis detallado de la zona (derecho, izquierdo, inferior y lejos).

En la figura 5.2 se observa el tornillo implantado en el cóndilo femoral. Podemos observar en este primer ejemplo que el área analizada corresponde a la zona derecha del tornillo (en amarillo). En las imágenes de la derecha se ven las distintas perspectivas y debajo la reconstrucción en 3D de la zona analizada.

A continuación en la tabla 5.5 se recogen los parámetros numéricos obtenidos

OHAp 48h (30)

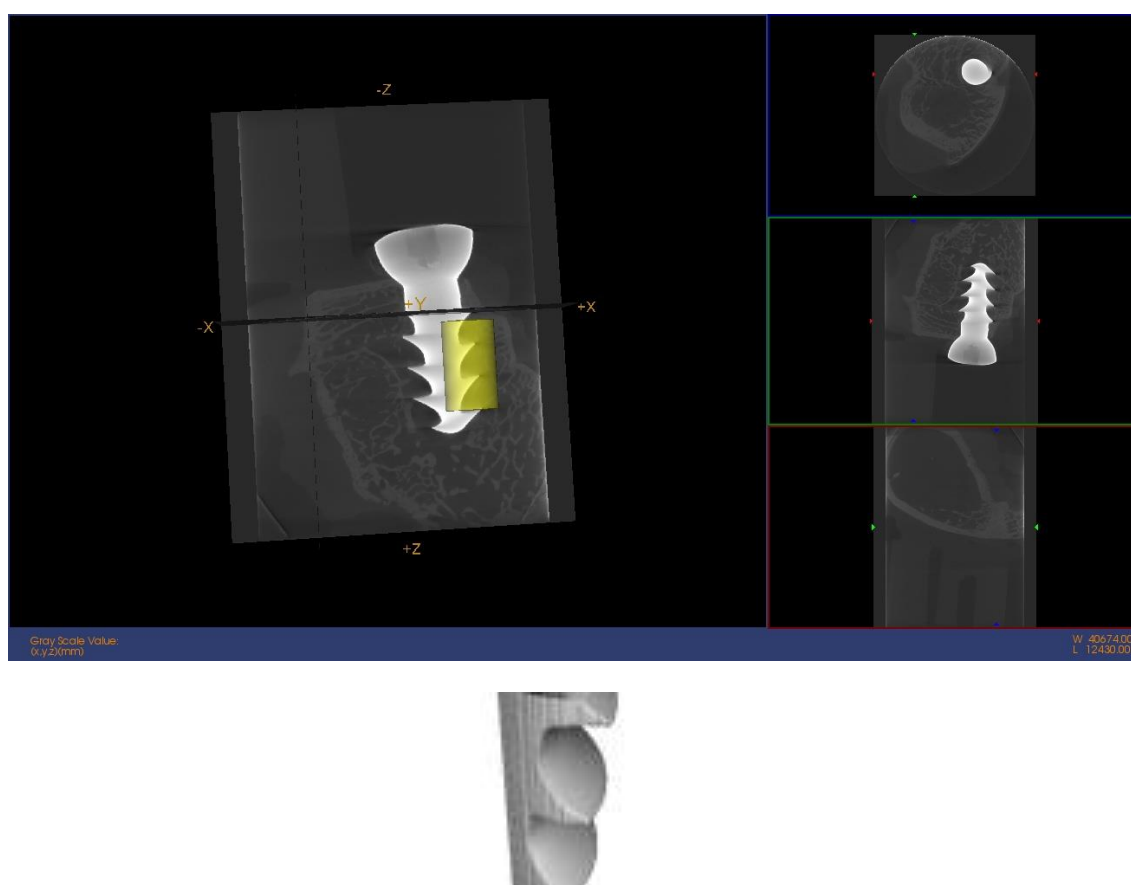


Figura 5.2 Imagen micro CT e imagen reconstrucción 3D. OHAp 30

BMD Resultados	
Media: 9936,2579	Std Dev: 10836,9
Volumen (mm ³): 33,909	Volumen de Hueso (mm ³): 9,9333
Voxels: 915158	BMC (mg) 15,0854
BMD (mg/cc): 444,8794	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,2929
Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 29,64	Tb.Sp. 3D (pixels): 41,85
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,988195	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,8605

Tabla 5.5 Resultados lado derecho OHAp 30

Zona próxima al tornillo (derecha).**Resumen de los datos analizados.****GRUPO CONTROL.**

24h		48h	5d
<u>BMD</u>	187,46/414,44/604,24	355,88	246,53
<u>BVF</u>	0,308/0,228/0,244	0,25	0,268
<u>TbTh</u>	1,873/1,638/1,047	0,89	1,096
<u>TbSp</u>	0,8167/0,779/0,83905	0,8459	0,85011

Tabla 5.6 Resumen datos lado derecho Control

GRUPO OHAp

24h		48h	5d
<u>BMD</u>	532,93/150,15	495,87/212,75	230,11/476,40
<u>BVF</u>	0,2605/0,223	0,214/0,307	0,213/0,122
<u>TbTh</u>	1,448/0,741	1,70/1,03	1,717/0,574
<u>TbSp</u>	0,78399/0,8467	0,79329/0,86442	0,75174/0,82043

Tabla 5.7 Resumen datos lado derecho OHAp

GRUPO OHAp-Fn

24h		48h	5d
<u>BMD</u>	653,46/236,67/432,57	444,87/393,43/367,23	251,86/472,38/303,97
<u>BVF</u>	0,293/0,179/0,181	0,292/0,341/0,287	0,276/0,206/0,319
<u>TbTh</u>	1,301/1,62/1,98	0,988/1,415/1,267	0,985/0,834/1,848
<u>TbSp</u>	0,78348/0,7452/0,6855	0,8605/0,8511/0,8237	0,8589/0,8403/0,8294

Tabla 5.8 Resumen datos lado derecho OHAp-Fn

En la figura 5.3 se observa el tornillo implantado en el hueso trabecular del cóndilo femoral y como en este caso la zona analizada es el área izquierda del tornillo. En las imágenes de la derecha se ven las distintas perspectivas del área analizada y debajo la reconstrucción en 3D.

A continuación en la tabla 5.9 se recogen los parámetros numéricos obtenidos para esta muestra.

Control 48h (15C)

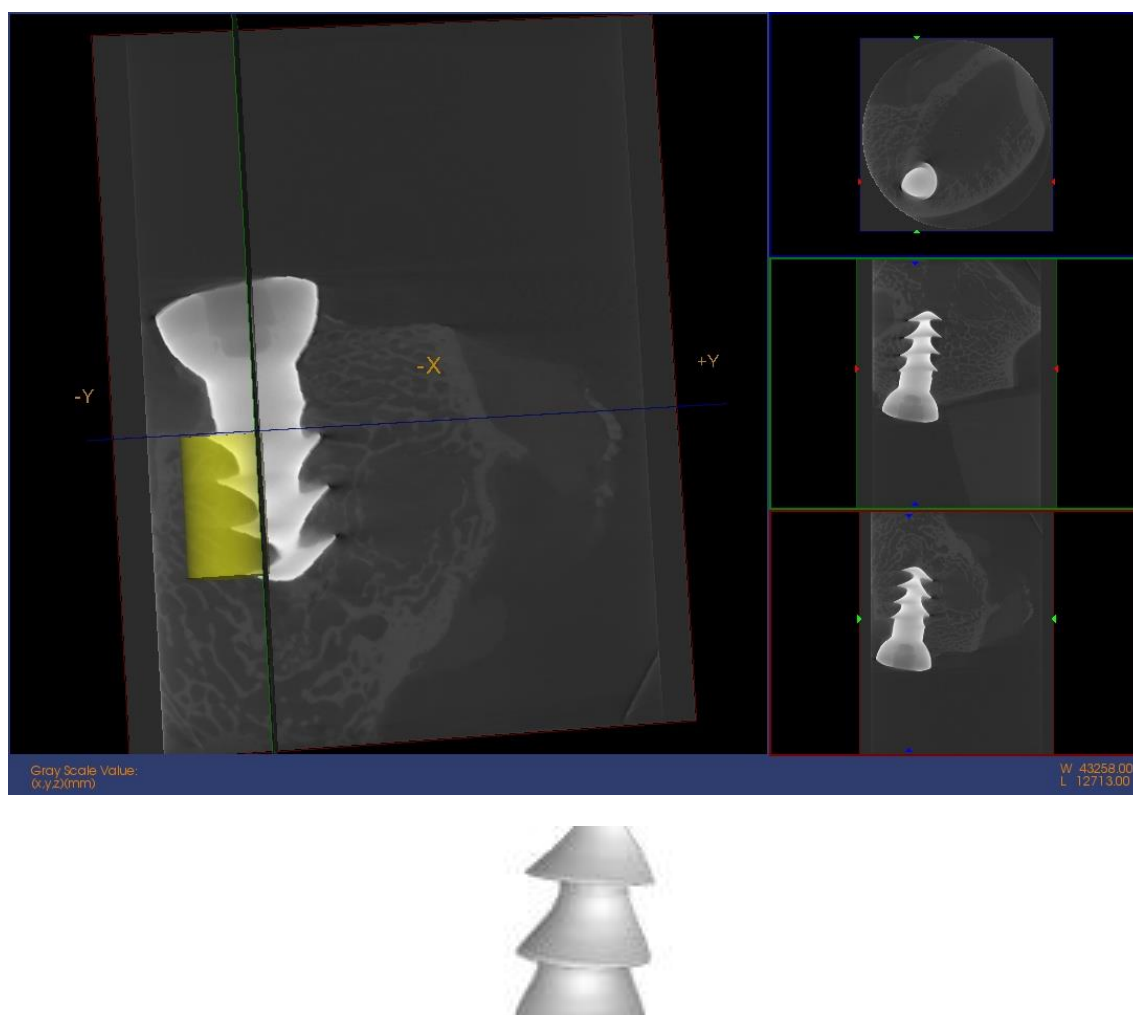


Figura 5.3 Imagen micro CT e imagen reconstrucción 3D. Control 15C

BMD Resultados	
Media: 6471,5697	Std Dev: 9032,85
Volumen (mm ³): 34,3354	Volumen de Hueso (mm ³): 34,3354
Voxels: 736540	BMC (mg) 14,6287
BMD (mg/cc):426,0541	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,1983
Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 26,87	Tb.Sp. 3D (pixels): 46,72
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,967228	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,83185

Tabla 5.9 Resultados lado izquierdo Control 15C

Zona próxima al tornillo (izquierda).**Resumen de los datos analizados.****GRUPO CONTROL.**

24h		48h	5d
<u>BMD</u>	249,66/244,74/757,80	426,05	341,77
<u>BVF</u>	0,23/0,263/0,195	0,198	0,313
<u>TbTh</u>	1,584/1,837/0,768	0,967	1,374
<u>TbSp</u>	0,7791/0,7831/0,84428	0,83185	0,8558

Tabla 5.10 Resumen datos lado izquierdo Control

GRUPO OHAp

24h		48h	5d
<u>BMD</u>	503,63/286,73	331,79/258,65	221,46/235,96
<u>BVF</u>	0,201/0,455	0,355/0,285	0,211/0,227
<u>TbTh</u>	1,229/1,288	2,173/1,102	1,864/0,839
<u>TbSp</u>	0,76741/0,90294	0,82641/0,85888	0,76427/0,83923

Tabla 5.11 Resumen datos lado izquierdo OHAp

GRUPO OHAp-Fn

24h		48h	5d
<u>BMD</u>	828,039/453,02/100,95	282,089/298,441/320,932	218,98/339,19/448,341
<u>BVF</u>	0,417/0,269/0,043	0,197/0,151/0,208	0,168/0,167/0,201
<u>TbTh</u>	2,071/1,527/1,18	0,814/1,086/0,915	0,677/0,688/1,741
<u>TbSp</u>	0,81309/0,60163/0,8151	0,8415/0,77851/0,84316	0,83351/0,82664/0,77035

Tabla 5.12 Resumen datos lado izquierdo OHAp-Fn

En el siguiente ejemplo, figura 5.4, el análisis detallado de la muestra corresponde al área inferior del tornillo (en amarillo). Como en ejemplos previos, en el margen derecho de la imagen se observan distintas perspectivas del análisis y debajo la reconstrucción en tres dimensiones.

En la tabla 5.13 se recogen los datos de la muestra utilizada como ejemplo.

OHAp-Fn 5 días (36)

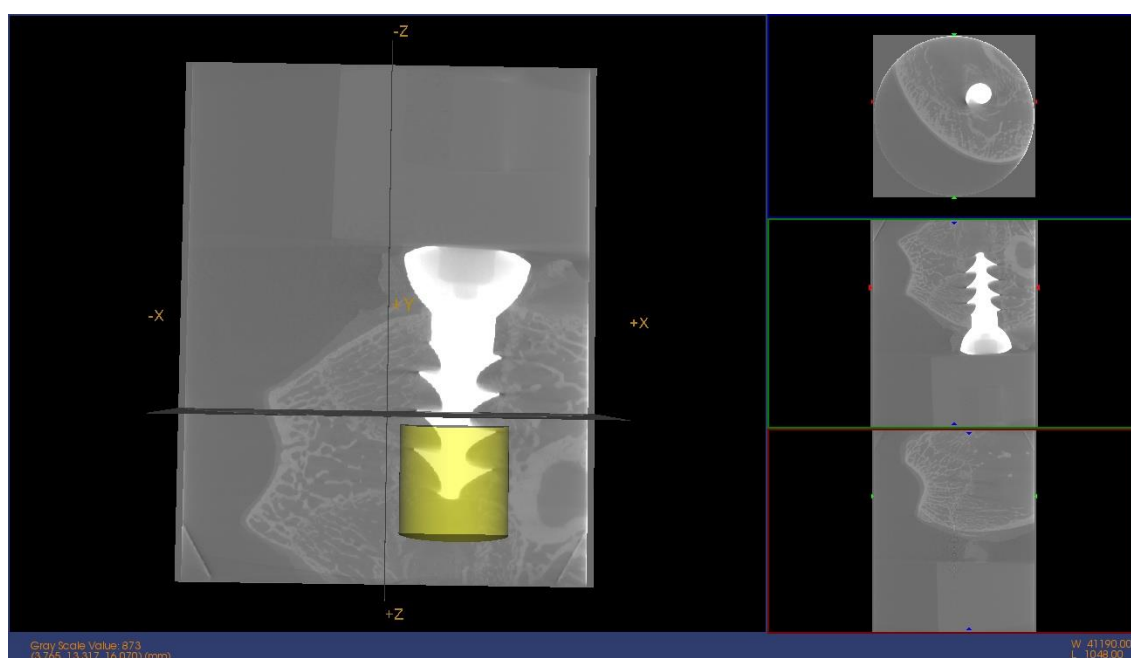


Figura 5.4 Imagen micro CT e imagen reconstrucción 3D. OHAp-Fn 36

BMD Resultados	
Media: 6367,6568	Std Dev: 11535,5
Volumen (mm³): 96,173	Volumen de Hueso (mm³): 16,2467
Voxels: 2595580	BMC (mg) 19,9691
BMD (mg/cc): 207,6379	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,1689
Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 50,65	Tb.Sp. 3D (pixels): 63,65
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,68858	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,78782

Tabla 5.13 Resultados lado inferior OHAp-Fn 36

Zona próxima al tornillo (inferior)**Resumen de los datos analizados.****GRUPO CONTROL.**

24h		48h	5d
<u>BMD</u>	192,113/282,04/628,152	345,429	308,832
<u>BVF</u>	0,252/0,286/0,227	0,209	0,203
<u>TbTh</u>	1,707/1,768/1,661	1,833	1,715
<u>TbSp</u>	0,8077/0,82777/0,84988	0,81965	0,80772

Tabla 5.14 Resumen datos lado inferior Control

GRUPO OHAp

24h		48h	5d
<u>BMD</u>	311,605/224,505	316,342/185,971	185,279/377,32
<u>BVF</u>	0,202/0,195	0,211/0,173	0,258/0,173
<u>TbTh</u>	1,692/1,764	1,625/1,704	1,666/1,696
<u>TbSp</u>	0,78068/0,82854	0,79102/0,79312	0,78903/0,81977

Tabla 5.15 Resumen datos lado inferior OHAp

GRUPO OHAp-Fn

24h		48h	5d
<u>BMD</u>	461,136/298,345/280,879	309,212/232,795/316,985	207,637/391,464/282,127
<u>BVF</u>	0,32/0,173/0,674	0,226/0,178/0,20	0,168/0,178/0,217
<u>TbTh</u>	1,717/1,599/1,881	1,711/1,777/1,788	1,688/1,743/1,702
<u>TbSp</u>	0,83147/0,71669/0,9357	0,85999/0,7351/0,82072	0,78782/0,81569/0,77920

Tabla 5.16 Resumen datos lado inferior OHAp-Fn

Por último en el siguiente ejemplo, figura 5.5, se examina un área alejada del tornillo (en amarillo). En el margen derecho de la imagen se observan distintas perspectivas del análisis y debajo la reconstrucción en tres dimensiones del ejemplo escogido, donde se puede identificar el entramado trabecular del hueso.

En la tabla 5.17 se recogen los datos de la muestra utilizada como ejemplo y que corresponden al área descrita previamente.

OHAp 24h (6)

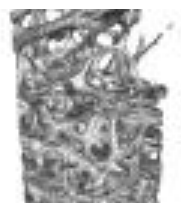
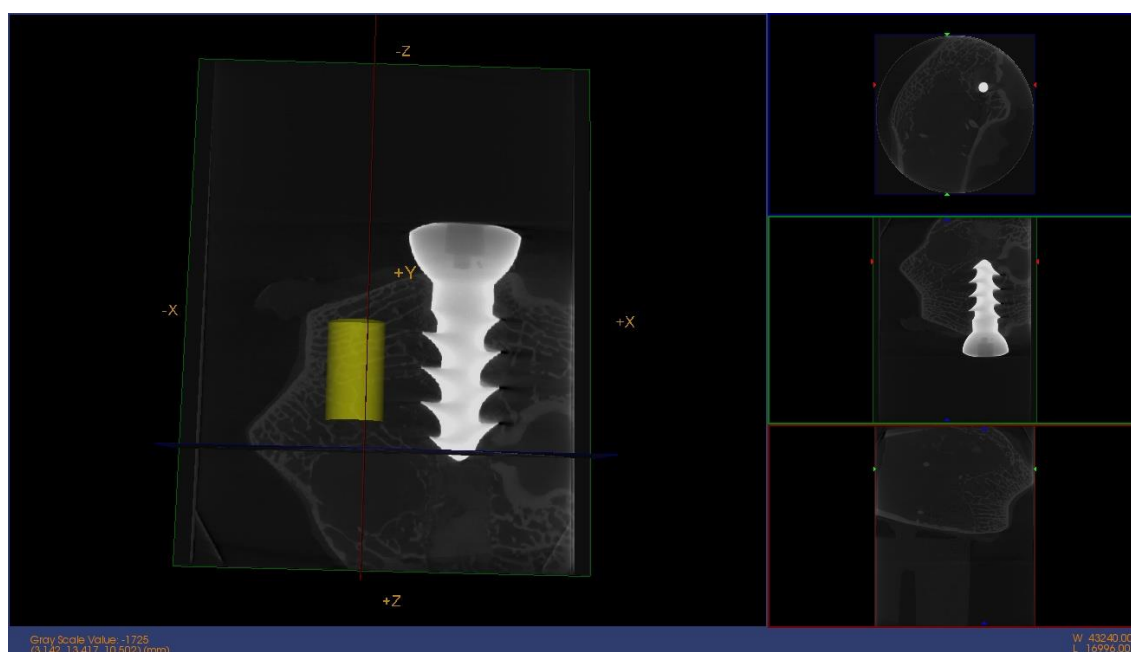


Figura 5.5 Imagen micro CT e imagen reconstrucción 3D. OHAp 6

BMD Resultados	
Media: 480,4586	Std Dev: 921,033
Volumen (mm³): 34,5502	Volumen de Hueso (mm³): 8,6469
Voxels: 741148	BMC (mg) 3,873
BMD (mg/cc): 112,0977	TMC (mg): 3,2756
TMD (mg/cc): 378,8167	BVF:0,2503
Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 2,7	Tb.Sp. 3D (pixels): 14,02
Calib. Tb.Th. 3D (mm):0,097041	Calib. Tb.Sp. 3D (mm):0,9496

Tabla 5.17 Resultados zona alejada OHAp 6

Zona alejada del tornillo**Resumen de los datos analizados. Zona alejada****GRUPO CONTROL.**

24h		48h	5d
<u>BMD</u>	228,605/83,762/157,191	195,429	159,497
<u>BVF</u>	0,41/0,209/0,253	0,3172	0,2985
<u>TbTh</u>	0,382/0,33/0,301	0,309	
<u>TbSp</u>	0,9651/0,93609/0,92366	0,94656	0,94806

Tabla 5.18 Resumen datos zona alejada Control

GRUPO OHAp

24h		48h	5d
<u>BMD</u>	265,524/112,097	385,324/279,324	212,12/177,566
<u>BVF</u>	0,287/0,25	0,405/0,317	0,281/0,247
<u>TbTh</u>	0,097	0,310/0,323	0,413/0,247
<u>TbSp</u>	0,94852/0,9496	0,96059/0,93424	0,93342/0,93284

Tabla 5.19 Resumen datos zona alejada OHAp

GRUPO OHAp-Fn

24h		48h	5d
<u>BMD</u>	249,412/518,766/82,406	158,929/244,99/372,338	175,257/239,622/390,143
<u>BVF</u>	0,258/0,387/0,273	0,253/0,203/0,317	0,335/0,331/0,373
<u>TbTh</u>	0,492/0,319	0,322/0,329/0,336	0,342/0,403/0,581
<u>TbSp</u>	0,94783/0,93695/0,93303	0,94305/0,87209/0,9433	0,94758/0,92933/0,93589

Tabla 5.20 Resumen datos zona alejada OHAp-Fn

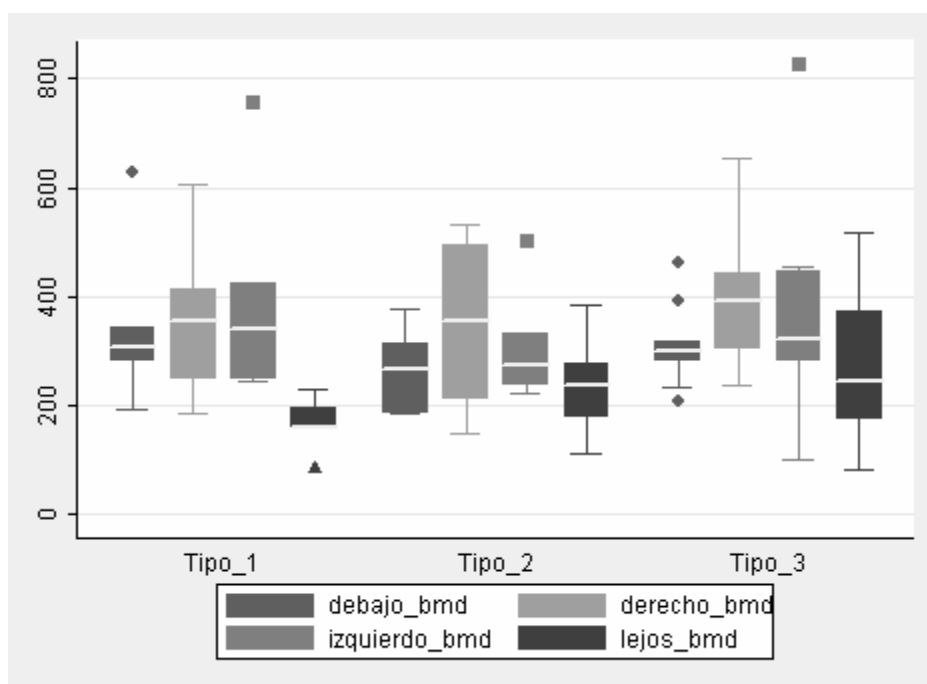
Análisis comparativo

Para poder determinar si realmente el biomaterial incrementa la fijación del tornillo al hueso, se realizan comparaciones entre las zonas próximas al tornillo (derecha, izquierda y debajo) con respecto a una zona más alejada del tornillo.

Se analizaron las 4 variables (BMD, BVF, TbTh, y TbSp independientes del tiempo) mediante un test no paramétrico de Wilcoxon

BMD. Tabla 5.21 Análisis comparativo. Gráfico 5.9 Análisis comparativo.

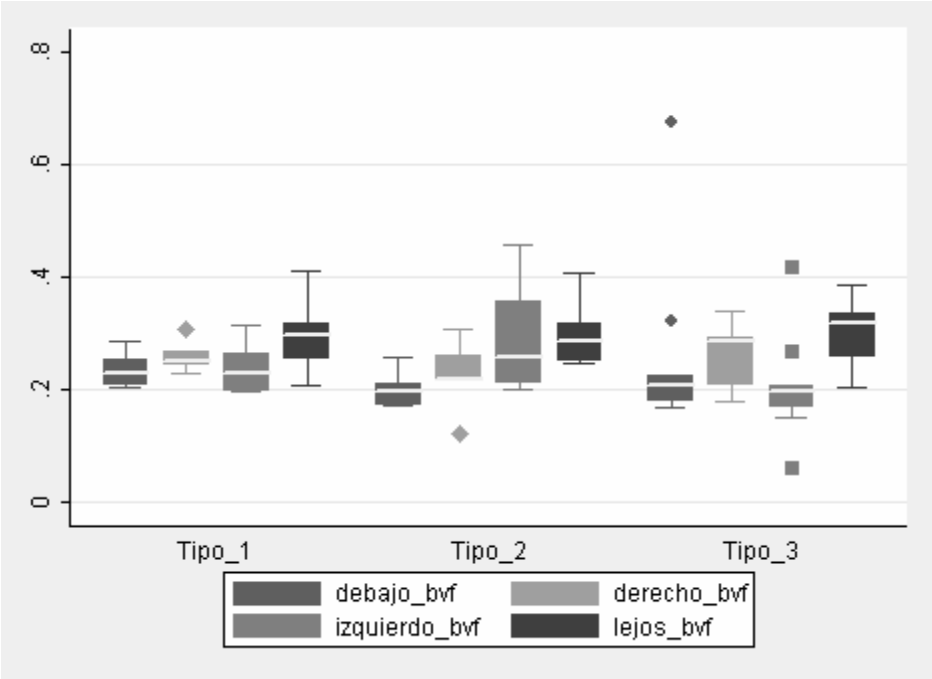
P=	Control (1)	OHAp (2)	OHAp-Fn (3)
Debajo-Lejos	>0,05	>0,05	>0,05
Dcho.-Lejos	>0,05	>0,05	>0,05
Izqdo.-Lejos	>0,05	>0,05	>0,05



No se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para ninguna muestra.

BVF. Tabla 5.22 Análisis comparativo. Gráfico 5.10 Análisis comparativo.

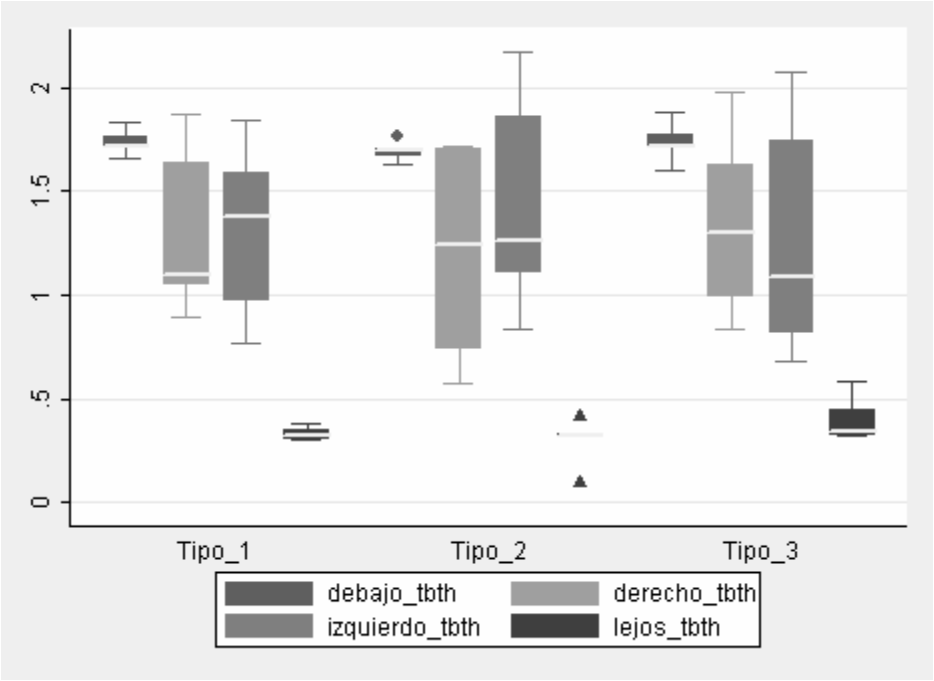
P=	Control (1)	OHAp (2)	OHAp-Fn (3)
Debajo-Lejos	>0,05	>0,05	>0,05
Dcho.-Lejos	>0,05	>0,05	>0,05
Izqdo.-Lejos	>0,05	>0,05	>0,05



El análisis comparativo para la variable BVF, no resultó estadísticamente significativo para ninguno de los tres tipos de muestra (Control, OHAp, OHAp-Fn) en los tres tipos de análisis comparativos.

TbTh. Tabla 5.23 Análisis comparativo. Gráfico 5.11 Análisis comparativo.

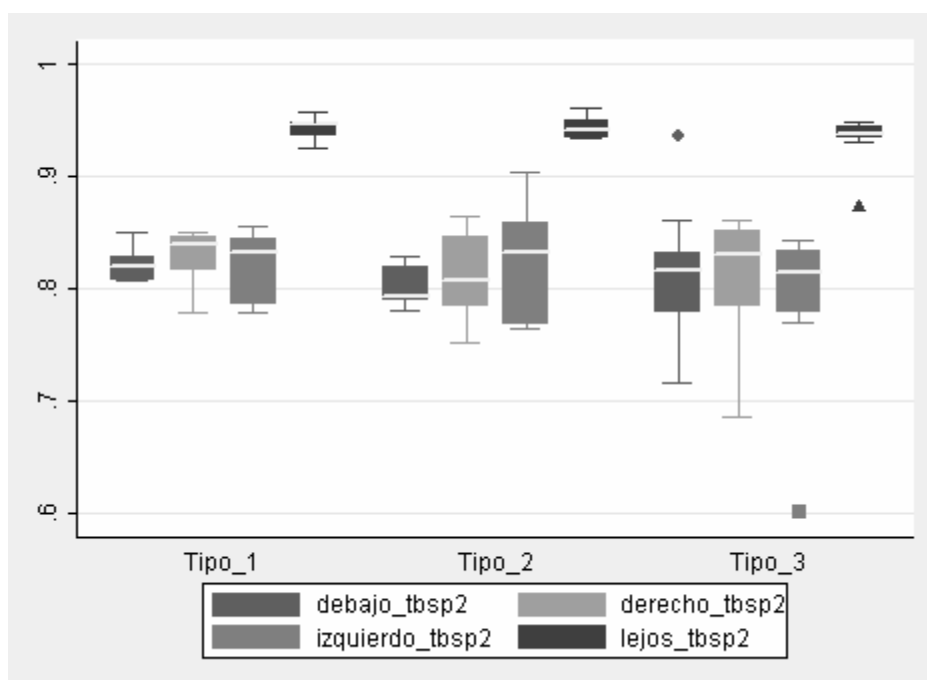
P=	Control (1)	OHAp (2)	OHAp-Fn (3)
Debajo-Lejos	0,0679	0,0431	0,0117
Dcho.-Lejos	0,0679	0,0431	0,0117
Izqdo.-Lejos	0,0679	0,0431	0,0117



El análisis comparativo de la variable TbTh, resultó ser estadísticamente significativo en las tres comparaciones (derecho-lejos, izquierdo-lejos y debajo-lejos) para la muestra OHAp, con una $p = 0,0431$, y para la muestra con proteína (OHAP-Fn) con una $p = 0,0117$.

TbSp. Tabla 5.24 Análisis comparativo. Gráfico 5.12 Análisis comparativo.

P=	Control (1)	OHAp(2)	OHAp-Fn (3)
Debajo-Lejos	0,0431	0,0277	0,0109
Dcho.-Lejos	0,0431	0,0277	0,0077
Izqdo.-Lejos	0,0431	0,0277	0,0077



El análisis de la variable TbSp resultó ser estadísticamente significativo para los tres tipos de muestra en las tres comparaciones. En el caso de los controles con una $p=0,0431$. Sin embargo el grado de significación es mayor tanto para OHAp con una $p=0,0277$ como en el caso de OHAp-Fn. Obteniendo en las muestras con proteína una grado de significación estadística de $p<0,01$ en dos de las comparaciones (derecho e izquierdo frente a la zona alejada)

RESUMEN ANÁLISIS COMPARATIVO

Tanto en las variables BMD como BVF, las diferencias entre las zonas próximas al tornillo y la alejada no alcanzan significación estadística para ninguno de los tres tipos de muestra (Control, OHAp y OHAp-Fn). En el caso de la variable BVF, sus valores son mayores para las zonas alejadas frente a las más próximas al tornillo en los tres tipos de muestra. Este hecho paradójico puede ser debido, al aumento del volumen por el brocado o a que parte del volumen analizado corresponde al tornillo, y el micro CT lo identificaría como un espacio vacío.

En cuanto a la variable TbTh, las diferencias no son estadísticamente significativas para los Controles. Sí que lo son en las tres comparaciones, tanto para el OHAp como para el OHAp-Fn. Sin embargo el valor de p para OHAp se sitúa próximo a $p=0,05$ (0,0431) mientras que en el caso de las muestras con Proteína se sitúa en torno a 0,01 (0,0117), alcanzando por tanto una mayor significación.

El valor para TbSp es inferior en todas la comparaciones tanto en los controles, OHAp y OHAp-Fn con una $p<0,05$. Sin embargo la mayor diferencia la volvemos a observar en las muestras con Proteína, con una significación estadística $p<0,01$.

5.2 RESULTADOS HISTOLOGÍA.

A continuación mostramos los resultados del análisis de las muestras mediante radiología, imagen lupa y microscopio, de los distintos grupos.

Como se detalla en el Protocolo Histológico, la tinción utilizada es el Azul de Stevenel.

Los resultados histológicos completos se adjuntan en el Anexo.

5.2.1 Grupo Control

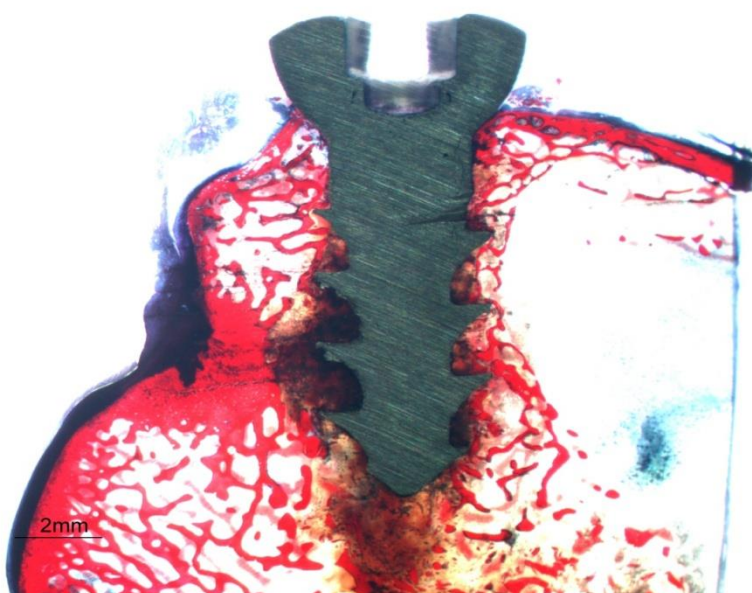
CONTROL 15 (48H)

Fig.5.5 Rx e imagen lupa.

Tornillo rodeado de hueso cortical y trabecular.

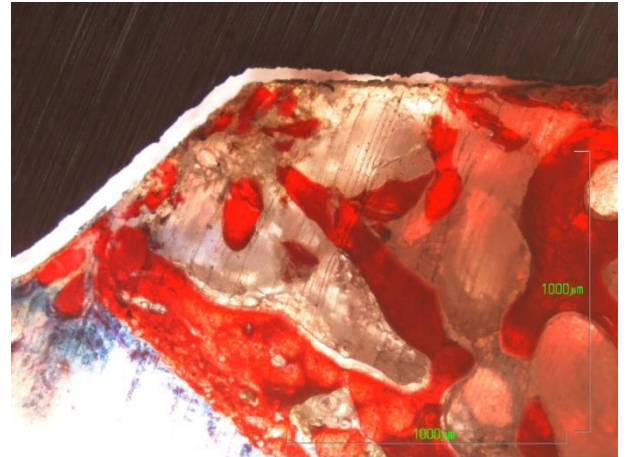
Restos de esquirlas óseas.

Desarrollo de una estructura fibrilar con células sobre la superficie del tornillo: tejido conectivo.

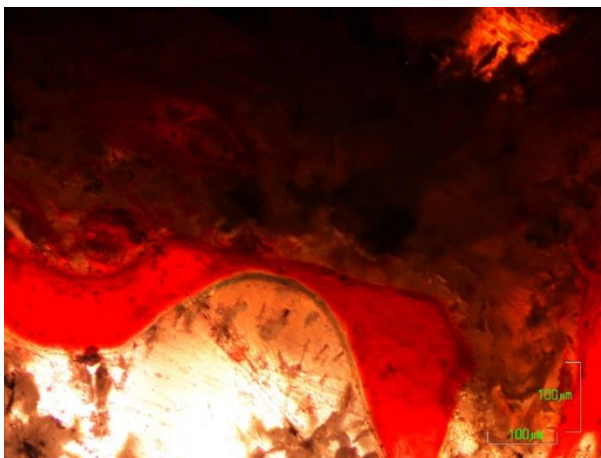




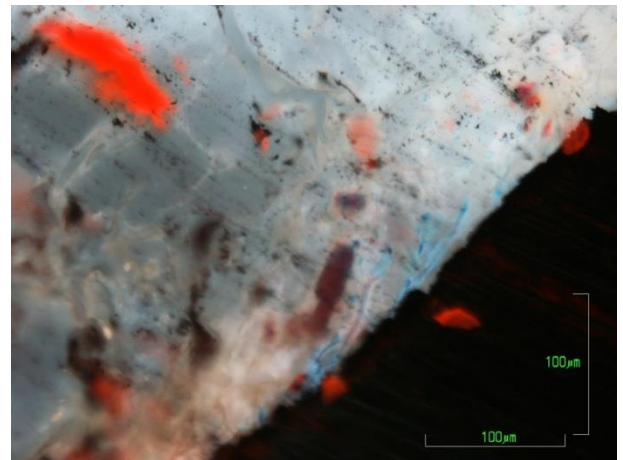
(4x) Fig.5.7 Zona cortical. Esquirlas de hueso al realizar el defecto. No formación ósea



(4x) Fig.5.8 Interior del defecto. Se distinguen restos de hueso roto debido a la realización del defecto



(10x) Fig.5.9 Trabécula seccionada al hacer el defecto, corte recto.



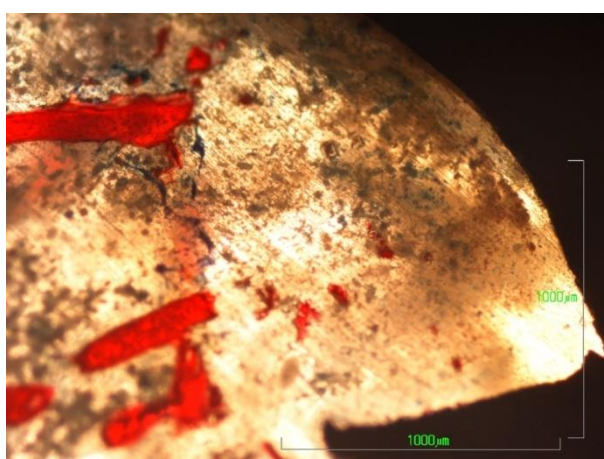
(20x) Fig.5.10 Detalle fibroblastos sobre superficie del tornillo.

RESUMEN GRUPO CONTROL

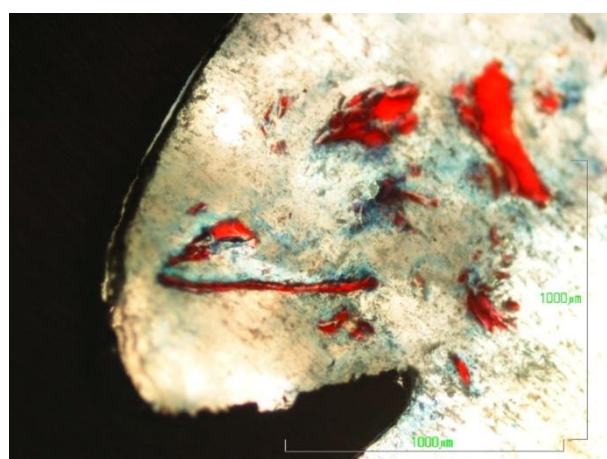
- En algunos casos encontramos una infiltración de tejido conectivo con elevado componente celular desde la zona del periostio provocada por la realización del defecto y posterior colocación del tornillo.
- Si el tornillo está alejado de la zona de hueso trabecular, a tiempos 24 y 48h, encontramos una respuesta celular menor y menor desarrollo de tejido conectivo.
- A los 5 días el tejido conectivo formado está más avanzado, con un componente celular y fibrilar más marcado.
- Encontramos escaso o leve componente celular de tipo inflamatorio.
- No respuesta hemorrágica.
- Control 3 (5 días) presenta una fractura.

OHAp 17 (5d).**Fig.5.11 Rx e imagen lupa**

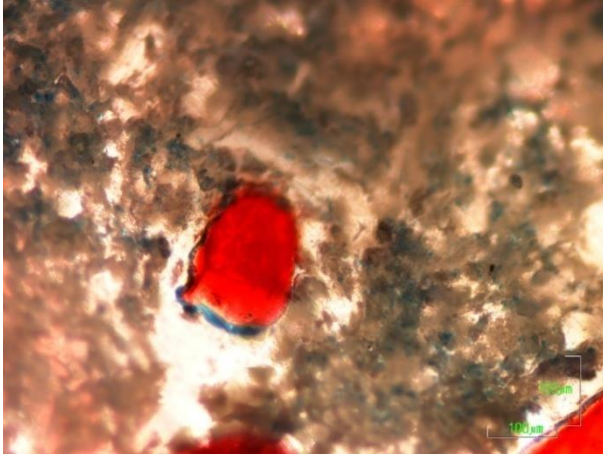
Tornillo colocado en hueso cortical, escaso hueso trabecular. Infiltración del tejido conectivo, con elevado componente celular. No crecimiento óseo sobre superficie del tornillo. Existe un componente celular de tipo inflamatorio y procesos de fagocitosis del material por medio de macrófagos



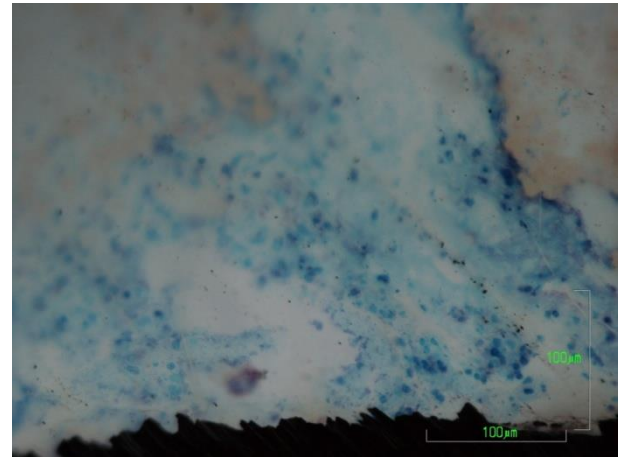
(4x)Fig.5.12 Se distingue el material que recubre al tornillo.



(4x)Fig.5.13 Esquirlas óseas aisladas. Superficie del tornillo sin crecimiento óseo.



(10x)Fig.5.14 Espícula ósea. Se aprecian restos de material y componente celular asociado al material.



(20x)Fig.5.15 Componente celular de tipo inflamatorio en el tejido conectivo. Ha penetrado el recubrimiento de material del tornillo.

RESUMEN GRUPO OHAp

- En algunos casos encontramos una infiltración de tejido conectivo con elevado componente celular desde la zona del periostio provocada por la realización del defecto y posterior colocación del tornillo. (OHAp 7 24h y OHAp 15 5 días).
- Encontramos material que recubre la superficie del tornillo en asociación con las esquirlas óseas y con desarrollo de tejido conectivo. El tejido conectivo formado presenta una mayor celularidad y componente fibrilar a los 5 días.
- Hay casos en los que los restos de material son escasos (OHAp 14 48h).
- En otros casos encontramos restos de material disperso, alejado de la superficie del tornillo, incluso asociados a macrófagos. (OHAp 17 5 días). También se han encontrado restos en la MOH (OHAp 20 5 días).
- Al igual que en grupo CONTROL, encontramos escaso o leve componente celular de tipo inflamatorio y ninguna respuesta hemorrágica.

5.2.3 Grupo OHAp-Fn

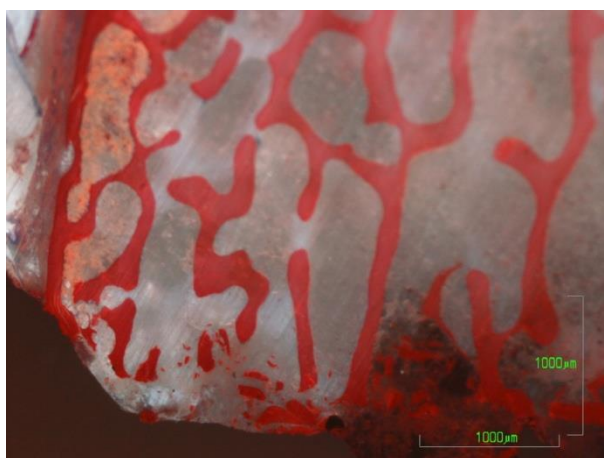
OHAP-Fn 28 (24H).

Fig.5.16 Rx e imagen lupa

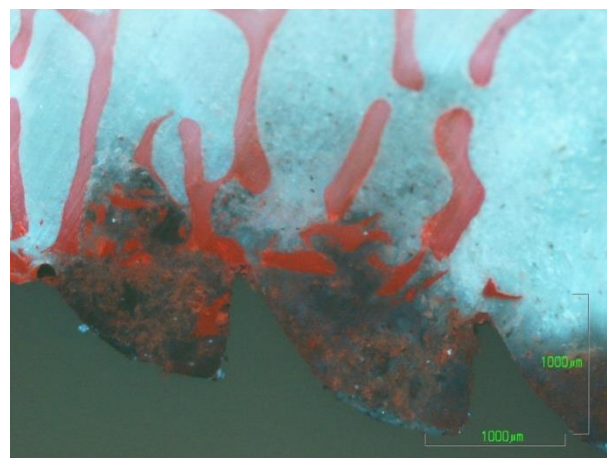
Implantación no exacta en el cóndilo, Más esquirlas en el lado del tornillo que está cercano a hueso trabecular.

Hay zonas con abundante celularidad..

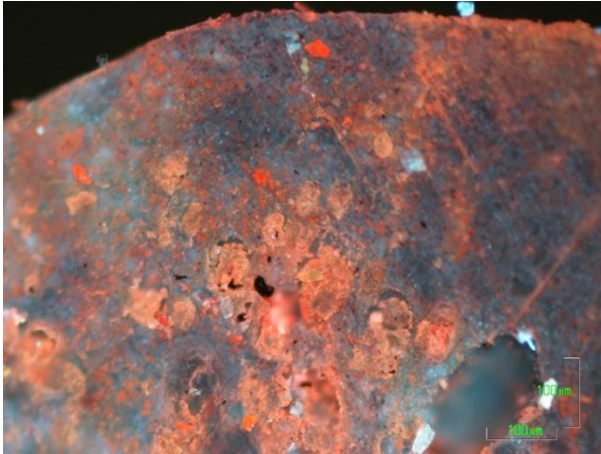
Restos de material



(2X)Fig.5.17 Panorámica zona superficial.



(2x)Fig.5.18 Interacción material-esquirlas óseas en superficie del tornillo.



(10x)Fig.5.19 Detalle superficie del tornillo. Prácticamente es todo material. Se aprecian células



(10x)Fig.5.20 Superficie del tornillo: mayor componente celular en asociación con el material.

RESUMEN GRUPO OHAp-Fn

- En un caso encontramos una infiltración de tejido conectivo con elevado componente celular desde la zona del periostio provocada por la realización del defecto y posterior colocación del tornillo. (OHAp-Fn 36 5 días).
- Encontramos material que recubre la superficie del tornillo en asociación con esquirlas óseas y con el tejido conectivo desarrollado. El tejido conectivo formado presenta una mayor celularidad y componente fibrilar desde las 24h.
- Aparecen células en asociación con el material, cerca de la superficie del tornillo desde las 24 h.
- En un caso encontramos restos de material dispersos, alejados de la superficie del tornillo, en la MOH (OHAp-Fn 33 48h).
- Al igual que en grupo CONTROL, encontramos escaso o leve componente celular de tipo inflamatorio y ninguna respuesta hemorrágica.

6. Discusión

Modelo experimental

Los modelos experimentales en osteoporosis, están jugando un papel fundamental en el conocimiento de la fisiopatología de la enfermedad y en el estudio preclínico de la eficacia y seguridad de nuevos tratamientos (101), sin embargo no están bien definidos los distintos modelos de interés para la Cirugía Ortopédica, fragilidad ósea, métodos de fijación y consolidación. Estos modelos deben ser diseñados teniendo en cuenta, que los objetivos buscados no tienen nada que ver con aquellos concebidos para el estudio de las propiedades de determinados fármacos o de la patología de la enfermedad. (102)

Si nuestro propósito es evaluar los métodos de fijación en el hueso osteoporótico, uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta, es que aunque la densidad mineral ósea, es un factor importante a la hora de evaluar la resistencia del hueso, la arquitectura del hueso trabecular cumple un papel determinante en la estructura ósea, sobre todo en las zonas de hueso metafisario y en la columna vertebral.

Por tanto, si queremos comprobar los métodos de fijación en animales para poder extrapolarlos al ser humano, debemos tener en cuenta que nuestro modelo animal debe asemejarse lo más posible a la estructura del hueso trabecular y a los cambios que suceden en el hueso osteoporótico. (103)

La osteoporosis se caracteriza por la reducción del grosor trabecular así como el aumento de la separación entre trabéculas. La mayoría de los animales utilizados para el estudio de la osteoporosis sufren cambios parecidos, sin embargo uno de los modelos más utilizados hasta ahora, la rata, carece de un sistema, además su pequeño tamaño hace que existan importantes diferencias de tamaño, en el grosor y la separación trabecular con respecto a los seres humanos. Diferencias que son aún más llamativas cuando lo que analizamos son tratamientos con materiales inyectables, como los cementos. (104)

Los animales de mayor tamaño, como el perro y la oveja, tienen un sistema, un remodelado óseo, un grosor y separación trabecular que son más semejantes a los del ser humano, que el de los roedores, sin embargo las consideraciones éticas, su tamaño que dificulta su estabulación y el coste hacen que tampoco sean el modelo ideal (105).

Para nuestro modelo in vivo hemos elegido el conejo. Hasta ahora los modelos para el estudio de fijación de fracturas en este animal son escasos, sin embargo sí que han sido utilizados por ejemplo para el relleno de defectos y el crecimiento óseo (106)

El conejo presenta un recambio óseo más rápido que el de otros roedores, alcanzando una madurez ósea al poco de llegar a su madurez sexual, hecho que no sucede en otros roedores como la rata (107).

Por otra parte el conejo posee un sistema de hueso semejante al del ser humano, con un grosor y separación trabecular diferentes al nuestro, pero de unas dimensiones suficientes para valorar los tratamientos con biomateriales inyectables. Además posee un tamaño perfecto, que permite una estabulación de un número importante de

ejemplares sin necesitar grandes espacios. El coste de los ejemplares no es demasiado elevado si lo comparamos con otros animales como la oveja o el perro. Sus dimensiones hacen que la cirugía no sea un proceso demasiado farragoso como ocurre en otros roedores, sobre todo cuando trabajamos con huesos largos (fémur, tibia...)

Pero sin lugar a dudas uno de los puntos fuertes del conejo como modelo para el estudio de la fijación en fractura osteoporótica, es el hecho de que existan modelos de inducción de la osteoporosis bien documentados, y fácilmente reproducibles, como expondremos más adelante.

Sin embargo no existe el modelo perfecto, ya que hay características que aún no hemos sido capaces de reproducir. Por ejemplo la porosidad cortical presenta importantes diferencias entre los distintos modelos animales, siendo muy baja para los roedores y alta para los perros. Sin embargo no hay ningún modelo animal que muestre una porosidad parecida a la del hueso humano. Los altos niveles de porosidad cortical parecen explicar la fragilidad del hueso osteoporótico humano, que puede ser la causa de las fracturas de baja energía que aparecen en los individuos con osteoporosis y que no se han observado en ningún modelo animal (108).

Por tanto las características que debemos buscar en un modelo animal para el estudio de los métodos de fijación son:

- El animal debe poseer una estructura ósea comparable con la del ser humano.
- Posibilidad de crear un modelo osteoporótico fiable
- Disponibilidad, coste y estabulación asumibles

- Modelo fácilmente reproducible.

Sin lugar a dudas el conejo cumple con todas las características anteriormente descritas.

Modelo osteoporosis en conejos

Si queremos comprobar si realmente, el biomaterial utilizado en esta tesis mejora la fijación del tornillo al hueso, resulta indispensable probarlo en un modelo lo más semejante posible al hueso osteoporótico humano.

Existen estudios en los que intentan comprobar la mejora de los métodos de fijación, utilizando modelos in vitro con materiales como el poliuretano cuyas características se podrían asemejar a las características del hueso. Estos estudios pueden suponer un punto de partida para comprobar las propiedades de los materiales y sus características físico-químicas. Sin embargo para comprobar su aplicabilidad, la toxicidad de sus productos de degradación, su interacción con los tejidos (actividad pro inflamatoria, osteoinducción, osteoconducción...) necesitamos de un modelo in vivo.

(109)

Existen modelos in vivo en animales como el conejo, en los que intentan simular la fragilidad del hueso osteoporótico a través de distintas técnicas, una de ellas es el “sobre brocado” del hueso. Primero utilizan una broca de un determinado tamaño y posteriormente una broca de mayor tamaño para debilitar aún más el hueso y conseguir una menor fijación del tornillo, simulando el déficit de anclaje del tornillo en el hueso osteoporótico. Con ello consiguen además un espacio suficiente para crear una interfaz entre el tornillo y el material inyectable que pretende mejorar la fijación, normalmente cementos cálcicos. Sin embargo, con esta técnica no conseguimos recrear las alteraciones de la micro estructura del hueso trabecular (separación y grosor trabecular) fundamentales para considerar, si con nuestro biomaterial conseguimos realmente mejorar la fijación del material de osteosíntesis (110).

Si queremos comprobar si nuestro biomaterial realmente mejora la fijación, debemos utilizar un modelo lo más parecido al hueso osteoporótico humano. Existen diversos modelos osteoporóticos en rata, conejo... en los que a través de diversos procedimientos se consigue reducir la densidad mineral ósea del animal y alterar la micro estructura del hueso trabecular.

En nuestro caso existen en la bibliografía diversos trabajos en los que con tratamientos con esteroides, esteroides más ooforectomía u ooforectomía aislada se consigue alterar la densidad mineral ósea, con reducciones de hasta el 40%, y modificar la estructura del hueso trabecular (97,98)

En el trabajo de Castañeda et al, se analizan diversos métodos para conseguir la osteoporosis en el modelo experimental con conejo. Proponen la ooforectomía más el tratamiento con corticoide a dosis intermedias (0,5mg/kg/día o 1mg/kg/día) o el tratamiento con dosis más altas de corticoides (1,5mg/kg/día) sin necesidad de ooforectomía durante 4 semanas, mientras que desaconsejan la ooforectomía aislada ya que por sí sola no consigue una reducción importante de la densidad mineral ósea con respecto a los controles, debido a que parece existir una producción endógena hormonal que suple en parte la falta de gónadas. La reducción más significativa la consiguen con el tratamiento combinado frente al protocolo con el corticoide aislado.

En nuestro trabajo nos decidimos por el tratamiento con dosis de corticoide de 1,5mg/kg/día ya que, tras realizar un ensayo previo con 3 conejos en los que

realizábamos ooforectomía, dos de ellos fallecieron, uno por una obstrucción intestinal debido a bridas intestinales causadas probablemente por la cirugía, y en el otro no se pudo determinar la causa.

Tras 4 semanas de tratamiento en las que administramos corticoide, mantuvimos a los conejos 2 semanas más de reposo para su preparación antes de la cirugía. Con dicho protocolo sólo tuvimos la pérdida de dos ejemplares, de un total de cuarenta y dos.

Si analizamos los niveles de densidad mineral ósea en los conejos del grupo control que se sacrificaron a las 24h, ya que desafortunadamente no tenemos niveles basales, su valor medio (335,853 mg/cc) se aproxima mucho al medido en el estudio de Castañeda et al (371mg/cc).

Pero la osteoporosis, no sólo se caracteriza por una disminución de la densidad mineral ósea, sino también por una alteración de la microestructura. Los valores medios para nuestros conejos en el grupo control a las 24 horas para el grosor y la separación trabecular son respectivamente (0,36mm; 0,81 mm) comparables a los que encontramos en otros estudios (111).

Por tanto, y aunque no disponemos de valores basales de la densidad mineral ósea y las características iniciales de la morfología del hueso trabecular de nuestros conejos,

los valores del grupo control de 24h son próximos a los existentes en otros estudios, lo que nos lleva a determinar que estamos ante un hueso osteoporótico y que el protocolo utilizado es muy recomendable, debido a la baja morbi/mortalidad que supone para el animal.

Necesidad o no de histología.

Hasta hace poco el *“gold standard”* para la evaluación de la regeneración ósea era la histología. Hoy este concepto está siendo puesto en duda por la aparición del micro-CT, que consigue un análisis detallado de las muestras en menor tiempo y sin alterarlas permitiendo posteriores análisis, como por ejemplo biomecánicos (100).

Gracias al micro-CT obtenemos información precisa acerca de la estructura del hueso, observando pequeñas modificaciones en distintos parámetros como el grosor trabecular, conectividad, separación entre trabéculas o la densidad mineral. Esta información no corresponde exclusivamente a una zona de la pieza analizada como ocurre en la histología, sino a toda la muestra.

Aunque el análisis histológico es un proceso más lento y que modifica las muestras de manera permanente, permite diferenciar el material implantado del hueso adyacente, hecho que no es identificable en el estudio por imagen. Podemos determinar además el tipo celular y de tejido presente en cada zona del análisis, distinguiendo por ejemplo si es inflamatorio o conectivo, o si observamos osteoblastos o fibroblastos. Además gracias a determinadas tinciones como la utilizada en este estudio (Azul de Stevenel) podemos observar el depósito de osteoide, adelantándonos a los posibles cambios en la densidad mineral ósea.

Estos hechos hacen que ambas pruebas sigan siendo necesarias para obtener unos datos completos de las muestras analizadas, sin poder decantarnos exclusivamente por una de las dos.

El biomaterial (síntesis)

El uso de biomateriales para mejorar la fijación en las fracturas no es algo nuevo. En 1962 Muller (112) ya propuso la utilización de PMMA para mejorar la fijación. Sin embargo estudios posteriores observaron que aunque sus propiedades mecánicas eran buenas, el hecho de que sus productos no sean degradables, la reacción exotérmica que se genera al implantarlo y su baja biocompatibilidad, no lo hacían un biomaterial muy atractivo (113,114).

En la búsqueda de nuevas alternativas, surgen los cementos de fosfato cálcico, con mejor biocompatibilidad, propiedades osteoconductoras u osteointegradoras según su forma de presentación pero con unas propiedades biomecánicas insuficientes, aunque distintos estudios muestran disminución en las tasas de fallo del material (115, 116).

En nuestro estudio planteamos mejorar los métodos de fijación mediante la combinación de Hidroxiapatita y fibronectina (de origen comercial). La Hidroxiapatita es el componente mineral principal del hueso. Es un fosfato de calcio con diferentes ratios de Ca y P según la forma de sintetizarla. La es una glicoproteína dimérica no colágena que posee el tripéptido RGD (Arg-Gly-Asp) y pertenece al grupo de proteínas conocidas como SIBLINGS (Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein) dentro del cual encontramos también a las sialoproteínas óseas. Son proteínas que intervienen en los procesos de remodelado y regeneración ósea con su secuencia RGD, reconocida por integrinas de osteoblastos y osteoclastos. También actúan como receptores de superficie permitiendo la adhesión celular a la matriz y la activación de señales.

Si queremos mejorar los métodos de fijación es necesario que nuestros biomateriales sean algo más que un andamio pasivo, deben promover e inducir la formación de hueso a través de la activación de los osteoblastos.

La estrategia que planteamos en esta tesis, es incrementar la bioactividad de nuestro material (hidroxiapatita) a través de la unión a su superficie de proteínas que contengan una secuencia RGD , que promuevan la adhesión de los osteoblastos y con ello la formación de hueso (117).

Cuando implantamos un material en el organismo, el primer fenómeno que sucede, es la interacción de éste con las proteínas del receptor (118). De la forma en la que se produce dicha interacción depende el éxito o el fracaso de nuestro material (119).

La Hidroxiapatita tiene una elevada afinidad por las proteínas, resulta fundamental por tanto conocer los factores de los que depende el éxito de dicha interacción. Factores como el peso molecular, el punto isoeléctrico, carácter hidrofílico o hidrofóbico del material... pero sin duda los factores a los que más tenemos que prestar atención y que se han tenido en cuenta en este trabajo, son (120):

- Tamaño de la partícula
- Tamaños de los cristales
- Superficie

Existen una serie de reglas básicas, a la hora de sintetizar los materiales como, a menor tamaño del cristal y de la partícula se favorece la formación ósea mientras que a mayor tamaño del cristal mayor reabsorción ósea (121).

Para sintetizar la Hidroxiapatita utilizada en este trabajo se añadió una pequeña cantidad de ácido poli-acrílico, que aunque reduce ligeramente la superficie útil del material consigue reducir el proceso de nucleación y con ello el tamaño del cristal (122).

Como hemos comentado previamente, se tuvieron en cuenta parámetros como el punto isoeléctrico de la proteína (5,6-6,1) (123), el carácter hidrofóbico, o la cantidad de proteína presente en la reacción (a mayor cantidad, mayor adsorción) (124).

Pero sin lugar a dudas los parámetros determinantes en la síntesis del material, para conseguir una mayor adsorción de proteína, son el tamaño de la partícula (menor tamaño más adsorción), del cristal (a menor tamaño más adsorción) y la superficie útil (mayor superficie más adsorción) (125). Éstos parámetros, ya se consideraban de manera independiente, pero no en conjunto.

Por tanto la adsorción de proteínas en los materiales es un proceso complejo. En el influyen múltiples factores como la concentración de proteína, el peso molecular o el punto isoeléctrico. Hasta ahora se le había dado poca importancia a las características

del material o andamio sobre el que se adsorbe la proteína. Para la síntesis de nuestro material tuvimos en cuenta distintos aspectos para favorecer la adsorción de (origen comercial) pero valorados en su conjunto y no de manera independiente. La Hidroxiapatita elegida fue la que presentaba unas características de tamaño del cristal y de la partícula y superficie más favorables (OHAp).

DISCUSIÓN

Con el presente trabajo intentamos no sólo definir las bases del estudio de la fractura osteoporótica en modelos animales, sino además aportar una alternativa a los distintos biomateriales existentes en estudio, tanto en humanos como en modelos animales, para mejorar la fijación en hueso osteoporótico.

La aparición de nuevos sistemas de osteosíntesis (placa bloqueada), ha reducido la aparición de complicaciones en hueso osteoporótico, reduciendo los fallos del material. Sin embargo estos buenos resultados son más importantes en hueso cortical que en el esponjoso (126), éste último se ve más afectado por la osteoporosis que el anterior, cuanto menor sea el grado de osteoporosis del paciente, y siempre que no tengamos un defecto óseo importante (127,128).

Los fallos de osteosíntesis en hueso osteoporótico, cuando utilizamos placas bloqueadas, han dejado de ser causados por el material (rotura placa, tornillos...) para producirse en la zona adyacente a éste. Puede ser debido al exceso de rigidez del constructo que además puede alterar el proceso de consolidación de la fractura, ya de por sí trastocado en el hueso osteoporótico (129). Con el aporte de materiales que no sólo mejoren la fijación del tornillo, sino que además promuevan la formación de hueso, como en el presente trabajo, podemos además mejorar el proceso de consolidación de la fractura. Por otra parte, no siempre podemos utilizar estos sistemas (cirugía de columna) por lo que la necesidad de incrementar la fijación de los tornillos en hueso frágil es fundamental.

Para incrementar la fijación de los tornillos, disponemos de distintas alternativas. Una de ellas puede ser modificar el diámetro y los materiales del tornillo (130) a la vez que se realiza una técnica quirúrgica adecuada a las características de éste hueso (131).

Otra de las alternativas disponibles, consiste en el recubrimiento de los tornillos con Hidroxiapatita. Existen diversos estudios que demuestran la mejora del anclaje del tornillo al hueso en los dispositivos recubiertos frente a los no recubiertos tanto en acero como en titanio (132, 133). Sin embargo aunque se trata de una buena alternativa, su efecto se reduce a la integración del tornillo y no tiene en cuenta el hecho de que el hueso adyacente sigue siendo un hueso frágil.

Para intentar no sólo incrementar la fijación, sino además tratar el problema de base, la osteoporosis, se ha propuesto la posibilidad de añadir al tornillo bifosfonatos, (134,135) sin embargo no ha llegado a materializarse debido a los riesgos existentes derivados del uso de éstos fármacos.

Ante la necesidad de conseguir materiales que mejoren la fijación y teniendo en cuenta que la mayoría de las fracturas osteoporóticas ocurren en hueso trabecular, el uso de biomateriales tipo cemento resulta ideal, ya que el incremento de la porosidad de dicho hueso, permite la difusión del material más allá de la zona más próxima al tornillo, creando un sinergismo entre el material y el hueso.

Existen distintos tipos de cementos de uso comercial como el PMMA o Norian. El primero dispone de unas propiedades mecánicas muy atractivas, ha sido utilizado tanto en miembros inferiores para mejorar la fijación (136,137) como en cirugía de columna para tornillos pediculares (138).

Sin embargo la reacción exotérmica que produce, su baja reabsorción, el riesgo de extravasación y la dificultad para poder retirarlo en caso de cirugía de revisión han limitado su uso.

Por esta razón se desarrollaron otros materiales con características más tolerantes con el medio, que mantengan unas propiedades mecánicas aceptables y que no interfieran en la extracción del material de osteosíntesis cuando sea necesario.

En los trabajos de Kagawoe et al (139) analizan la mejora en la fijación de los tornillos en hueso esponjoso tibial en conejos. Observan que a 1 y 3 meses después de la implantación y tras realizar estudios biomecánicos, los tornillos con Hidroxiapatita presentaban una mejor fijación que los controles, y a su vez no presentaban diferencias con respecto a tornillos con PMMA. En este estudio no analizaban cambios a corto plazo ni tampoco se realizaban pruebas de imagen, sí realizaban pruebas histológicas que constataban la baja reabsorbilidad del material.

En los estudios realizados por Hoshikawa et al (140), analizan mediante Histología e imagen (micro CT) los efectos de cementos de fosfato cálcico comparados con Hidroxiapatita en un modelo animal con conejos. En los estudios de imagen, sólo analizaban la presencia o no del biomaterial, constatando una reabsorción más rápida para el CPC frente a la HA a las 3 semanas. En el análisis Histológico a corto plazo no observaban cambios inflamatorios (3 y 7 días) y hacia las 24 semanas no se identificaba una gran cantidad de hueso trabecular, hallazgos que no variaban mucho a las 56 semanas. Sin embargo los estudio biomecánicos si mostraban una superioridad a las 6 semanas frente a los controles.

Larsson et al (115) estudiaron los cambios en la fijación de tornillos con CPC en un hueso con una densidad mineral aparentemente disminuida, al realizar un doble brocado del mismo y con 2 series de tiempos, una a corto plazo (24h, 5 y 10 días) y otra a largo plazo (6,12 y 26 semanas). Realizaron un estudio con micro CT en el que únicamente analizaban la densidad mineral ósea, con una tendencia de mayor BMD para las muestras con cemento frente a los controles, en la serie de tiempos más largos, y observando paradójicamente un mayor BMD para los controles en la serie de tiempos cortos, aunque las diferencias no eran estadísticamente significativas. En cuanto al análisis biomecánico las diferencias más importantes se observan dentro de los 10 primeros días sin encontrar diferencias significativas después.

En otros estudios en los que analizan la reconstrucción de defectos óseos con materiales como B TCP puro o B TCP + Hidroxiapatita como el de Seong Ho Choi et al (141), encuentran diferencias histológicas en cuanto a la formación de hueso a las 2 semanas con respecto a los controles, y las 8 semanas entre los materiales (mas hueso neo formado con la combinación que el B TCP aislado)

En nuestro estudio, nos decidimos por un modelo animal osteoporótico, para poder determinar si realmente nuestro material incrementaba la fijación del tornillo al hueso. En nuestro modelo optamos por tiempos cortos, como demuestran los estudios previos, los cambios más importantes en cuanto al incremento de las propiedades biomecánicas de los tornillos con cemento, se producen en fases iniciales aunque no observan cambios en la formación de hueso hasta las 2 semanas. Los análisis de imagen que realizan, en ningún caso nos ofrecen datos (grosor trabecular, separación

trabecular) de la morfología trabecular que nos permitan tener una idea de los efectos del material y sus diferencias frente a los controles.

Grupo OHAp (Hidroxiapatita) frente a grupo Control.

Para poder comparar dichos estudios con el nuestro y aunque algunos difieren en los tiempos, tomaremos en consideración solo el grupo de muestras con Hidroxiapatita y los controles, medidos a tres tiempos, 24 horas, 48 horas y 5 días. Efectuamos un análisis de imagen mediante micro-CT en el que determinamos la densidad mineral mediante las variables BMD (densidad mineral ósea) y la variable BVF (cantidad de hueso en el volumen total) y la morfometría del hueso trabecular mediante 2 variables TbTh (grosor trabecular) y TbSp (separación trabecular). Posteriormente realizamos un análisis histológico de las muestras, realizando cortes transversales del tornillo implantado en el cóndilo y utilizando como tinción Azul de Stevenel, para determinar si existe o no regeneración ósea.

En cuanto al análisis de imagen de las muestras realizamos:

- un análisis de la muestra independiente del tiempo
- un análisis dependiente del tiempo
- un análisis comparativo entre la zona próxima al tornillo y una zona alejada de la misma muestra.

En el análisis independiente del tiempo no se encuentran diferencias importantes de densidad mineral ósea entre las muestras con Hidroxiapatita y los controles, así como en la variable BVF, aunque esta tiene un valor mayor para la Hidroxiapatita.

En cuanto a las variables que nos definen la estructura del hueso trabecular, el grosor trabecular es mayor para las muestras con HA aunque también es mayor la separación trabecular para las muestras con material.

Si observamos el análisis en función del tiempo, la variable que determina la densidad mineral ósea se mantiene casi sin variaciones a lo largo del tiempo y es superior frente al valor de los controles, a diferencia del trabajo de Larsson et al (110), donde el BMD es mayor para los controles a tiempos cortos. La variable BVF permanece casi sin variaciones a lo largo del tiempo en las muestras con Hidroxiapatita, mientras que en los controles tiende a descender con el tiempo.

El grosor trabecular con el tiempo, mantiene una tendencia de crecimiento las primeras 48h manteniéndose estable hacia los 5 días, en los especímenes con Hidroxiapatita. Aunque en las muestras control solo disponemos de datos a las 24 horas y a los 5 días, el valor se mantiene constante a lo largo del tiempo. La otra variable que define la estructura trabecular, la separación entre trabéculas, tiende a aumentar a las 48 horas para luego descender su valor a los 5 días, sin poder establecer una comparación adecuada con los controles por los pocos datos disponibles.

Por tanto parece que la Hidroxiapatita si que tiene un efecto positivo en la microestructura del hueso trabecular, mejorando los valores del grosor y la separación

trabecular frente a los controles, estos datos se complementan con una tendencia positiva con el tiempo.

En cuanto a los valores de densidad mineral, los cambios no son significativos con respecto a los controles, aunque las muestras no presentan un descenso de estos valores con el tiempo, hecho que si observamos en el estudio de Larsson et al (110).

Si nos fijamos en los datos comparativos del análisis de la misma muestra en distintas zonas, observamos diferencias con significación estadística para los parámetros que definen el hueso trabecular (TbTh y TbSp), lo que indica los efectos positivos del material sobre la zona de implantación.

Sin embargo la limitación que presenta dicho análisis, es sin duda, el número de muestras analizadas.

En el análisis histológico podemos observar la presencia del material a los 5 días. No se evidencia una reacción inflamatoria significativa a ninguno de los tres tiempos, lo que confirma la biocompatibilidad del material. La celularidad es más significativa con respecto a los controles a los 5 días, sin poder evidenciarse depósito de osteoide por parte de los osteoblastos. No hay depósito de tejido óseo nuevo, resultado que corresponde con el análisis del micro-CT, pero sí tejido conectivo y células que suponen el primer paso para su formación.

Por tanto después de estos análisis podemos concluir, que la Hidroxiapatita mejora la morfología del hueso trabecular, sin que se pueda determinar una mejora en los valores de densidad mineral ósea. Por todo ello estos datos no son lo suficientemente

fuertes para poder determinar que sólo con la Hidroxiapatita, podemos conseguir una mejor fijación del tornillo en hueso osteoporótico.

Andamios más material osteoinductor.

La Hidroxiapatita es un material osteoconductor, pero con una actividad osteoinductora nula. Por ello necesita de algo más que promueva la formación de hueso, y aprovechando que es un excelente soporte para servir de andamio, nos decidimos a utilizar un material que combinase las propiedades osteoconductoras de la Hidroxiapatita, y el efecto osteoinductor de la.

En la actualidad, esta fórmula que combina el soporte osteoconductor y la estructura osteoinductora ya se está probando en modelos animales, e incluso de manera clínica con distintos resultados.

De las características de los andamios utilizados como soporte, cementos de sulfato de calcio, fosfato cálcico..., ya hemos hablado previamente, en cuanto a las sustancias osteoinductoras, existen fundamentalmente dos opciones los PRPs y las proteínas morfogénicas (BMP)

- PRP

El plasma rico en plaquetas o PRP, es una opción como material osteoinductor muy utilizada en los últimos años (142) por distintas razones, entre ellas destacan la ausencia de fenómenos de rechazo ya que la fuente de células proviene del propio paciente a través de un ultra filtrado del plasma, reduce la morbilidad del autoinjerto y

aporta numerosos factores de crecimiento presentes de manera natural en las fracturas. Los estudios realizados en modelos animales presentan resultados dispares. La mayoría de estos estudios utilizan los PRP, para el relleno de defectos o el tratamiento de la pseudoartrosis.

En el estudio llevado a cabo por Bigham et al (143), utilizan los PRP en combinación con Hidroxiapatita en un modelo de consolidación de fracturas en conejos. Realizan estudios de imagen mediante radiografías e histología. En las pruebas de imagen observan una mayor consolidación en el grupo de HA+PRP a los 42 y 56 días post implantación frente al grupo de Hidroxiapatita y a los controles, confirmando estos hallazgos con la Histología, con mayor densidad mineral ósea y actividad angiogénica en el grupo de PRP.

Otro trabajo que analiza los efectos sobre el relleno de defectos óseos en conejos, es el llevado a cabo por un grupo de trabajo Brasileño (144) que compara los efectos de los PRP junto con B TCP, frente a un aspirado de médula ósea más BTCP. Los estudios radiológicos a las 4 semanas muestran la consolidación de todos los fémures menos uno, en ambos grupos. En cuanto al análisis histológico, en el grupo que utiliza PRP, se observa un grosor cortical y una densidad mineral ósea mayor. Una de las limitaciones de este estudio, es la ausencia de grupo control, y otra el hecho que no aporten datos del remodelado en el hueso trabecular.

En el trabajo realizado por P. Hardouin et al (145) analizan la influencia de la implantación de los biomateriales en distintas zonas del hueso. Observan como el remodelado óseo es más intenso en el hueso cortical frente al hueso esponjoso. Y un remodelado prácticamente nulo en la zona medular, donde la biodegradación de los

materiales es mayor. Por ello concluyen que para poder valorar adecuadamente los efectos de los biomateriales, es preferible realizarlo en la zona de hueso esponjoso, que es donde se observa un equilibrio entre las propiedades osteoconductoras u osteoinductoras del material y su biodegradación.

En la literatura también podemos encontrar otras investigaciones que sugieren el efecto positivo de los PRP (Kassolis et al 2000 (146); Robiony et al 2002 (147); Rodriguez et al 2003 (148)). Sin embargo también encontramos numerosos estudios en los que los resultados positivos de los PRP son discutidos.

Uno de ellos es el llevado a cabo por Aghaloo et al (149), en el que analiza la evolución de defectos óseos en el cráneo de conejos. En este estudio randomizado, se analizaban las diferencias entre autoinjerto, PRP, autoinjerto + PRP, y el grupo control. Los cambios se valoraban mediante Histología y Radiología a 1, 2 y 4 meses. Los cambios más significativos se observaban en el grupo de hueso autólogo y en el PRP + autoinjerto con respecto a los otros dos. Pero entre estos dos grupos no existían diferencias significativas

Otro trabajo de investigación es el llevado a cabo por Plachokova et al (150), en el que analiza el relleno de defectos óseos en el cráneo de ratas, con B TCP + HA (40/60), B TCP + HA + PRP y grupo control. En este caso analizan las muestras a 1, 2 y 4 semanas mediante micro- CT e Histología. No encuentran diferencias entre usar o no PRP, las mayores diferencias con respecto al grupo control las obtienen en la 1ª semana, igualándose prácticamente los efectos a las 4 semanas.

Un estudio randomizado más reciente es el llevado a cabo por Wiltfang et al (151) , en el que compara distintos biomateriales ya comercializados en el mercado (CeraSorb, BioOss, ColloSst) con y sin PRP, con autoinjerto con y sin PRP en defectos críticos en el cráneo de cerdos. Los resultados se analizan a 2, 4, y 12 semanas mediante radiología e inmunohistología. En este caso no evidencian diferencias entre añadir o no PRP a los biomateriales, pero sí que evidencian un mejor relleno del defecto si al autoinjerto le añadimos PRP frente a no hacerlo.

En el caso de los modelos animales, como hemos podido constatar existen resultados muy diferentes. En cuanto a los efectos de los PRP en el caso de estudios clínicos como el de Carreon et al (152) no observan beneficio alguno en el uso de los PRP para promover la consolidación ósea tras cirugía de columna (artrodesis posterolateral)

La posible causa de estas diferencias y los pobres resultados clínicos pueden ser debidos a la ausencia de criterios estandarizados, de la cantidad necesaria de PRP para cada caso. La cantidad de PRP obtenido por los métodos habituales probablemente aporte unas concentraciones demasiado bajas de factores de crecimiento. Sin embargo mientras que Wiltfang et al (151) obtiene mejores resultados con dosis mayores de PRP frente a estudios previos con menores dosis, Aghaloo et al (149) no encuentra ninguna correlación entre la cantidad de PRP y los efectos observados.

Por otra parte los PRP ejercen su efecto en células vivas, es por ello que su uso combinado con materiales sintéticos no celulares, tenga unos resultados pobres frente a su uso junto a auto o aloinjerto.

- BMP

Otra de las posibilidades existentes actualmente son las BMPs (Bone morphogenic proteins) consideradas como las proteínas con mayor poder osteoinductor, son los únicos factores de crecimiento, que han conseguido la formación de hueso ectópico a partir de células precursoras mesenquimales (143, 153)

Las BMP se encuentran en el hueso y en otros tejidos, forman parte de la familia de factores de crecimiento TGF B (excepto BMP 1). Desencadenan una cascada de activación proteica que induce la formación ósea a través de su interacción con los osteoblastos. Existen unas 20 BMP, de las cuales 2, 4, 6 y 7 son las más relevantes en el tejido óseo, y de éstas dos, BMP 2 y la BMP 7 son comercializadas por distintas empresas.

Los estudios in vivo en modelos animales, muestran resultados bastante positivos. Turgeman et al (154) en un modelo animal en ratones con osteoporosis senil y post menopáusica, consigue a través de la administración de BMP 2 intravenosa el incremento del volumen trabecular. Observan un incremento en el número y una reducción de la apoptosis en las células precursoras mesenquimales.

Simic et al (155) en un estudio posterior, en un modelo animal de rata osteoporótica (ooforectomizada), consigue un incremento del hueso trabecular en el esqueleto axial mediante la administración exógena de BMP 6. Observan un incremento del grosor trabecular, el número de trabéculas y la conectividad entre éstas. Estos efectos se observaron tras 6 semanas de terapia, y se mantuvieron 12 semanas más tras el tratamiento. Dichos hallazgos no se observaron cuando el mismo estudio se realizó con BMP 7.

En 2006, Phillips et al (156), llevan a cabo el primer estudio de los efectos de las BMP en ovejas osteoporóticas (ovariectomizadas). Tras crear un defecto en las vertebras del animal, analizan la microarquitectura del hueso tras aportar BMP sobre un soporte o “carrier” que podía ser PLGA (ácido poli glicólico) o carboximetilcelulosa. A los seis meses observan una mejora de la microarquitectura del hueso trabecular en la zona más próxima al defecto, sin encontrar cambios significativos del BMD en toda la vértebra.

Posteriormente Lu J et al (157), realizan un estudio semejante en el que analizan la fusión tras artrodesis posterolateral en la columna de ratas ovariectomizadas, a las que añaden BMP 7 y un soporte (carboximetilcelulosa). En este caso no obtienen resultados positivos con las dosis habituales de BMP 7, pero sí cuando incrementan estas dosis por 3 y modifican las características del soporte.

Uno de los estudios más recientes (2013) combina el efecto de PRP y BMP en el relleno de defecto óseos en un modelo animal con conejos. Analizan los efectos creados en el cráneo a las 6 y 12 semanas, en distintos grupos (control, calcio fosfato bifásico BCP, BCP + PRP, BCP + BMP, BCP + PRP + BMP) El estudio radiológico revela que el grupo con BCP + BMP independientemente de si lleva o no PRP tiene mayor porcentaje de hueso. El análisis histológico determina sin embargo, que los rellenos con BMP y PRP presentaban más porcentaje de hueso a las 6 semanas que el resto de defectos, diferencia que tendía a igualarse a las 12 semanas con el resto grupos. Concluyen que el PRP presenta un efecto sinérgico con el BMP al inducir una mayor angiogénesis en el defecto creado (158).

Sin embargo los estudios clínicos en humanos no son tan prometedores como en los modelos animales. En la literatura encontramos estudios no randomizados como los de Jhonson y Urist (159) en el que tratan con BMP pseudoartrosis de tibia y fémur. Pero sin que exista un grupo control, por lo que no podemos determinar si estos buenos resultados, son debidos a las BMPs o a la técnica quirúrgica por ejemplo. Kujala et al (160, 161) publica posteriormente otro estudio no randomizado en el que analiza la consolidación de la no unión de 10 fracturas de escafoides tras el aporte de BMP. Solo consigue la consolidación en dos de ellas. Años después presenta un trabajo semejante en el que analiza la consolidación de pseudoartrosis tras fractura de cúbito en 5 pacientes. En este caso consigue la consolidación de todas ellas, pero carece de nuevo de grupo control y en esta ocasión no sólo añade BMP, sino también injerto de cresta del propio paciente.

En cuanto a estudios randomizados, hay pocos en la bibliografía. Uno de los primeros es el de Friedlaender et al (162) en el que compara la consolidación de la pseudoartrosis de tibia tratándola con enclavado endomedular fresado más aporte de injerto autólogo, y el enclavado con fresado y aporte de BMP. Los resultados son similares en los dos grupos, pero la ausencia de un tercer grupo control, en que se realizase un enclavado con fresado sería necesario para poder comparar los efectos de los BMP, ya que el fresado ya supone un aporte natural de BMP.

Otro estudio semejante publicado en 2002 (estudio BESTT), compara los efectos de los BMP a distintas dosis y con respecto a los controles (no aporta BMP). En este estudio diseñado en fracturas tibiales cerradas tratadas con clavo endomedular, observaban una consolidación más rápida y menor número de pseudoartrosis y retardos de

consolidación, en el grupo con mayor dosis. Sin embargo en este grupo también había un mayor número de clavos fresados con respecto al grupo de menor dosis (163).

Por tanto a pesar de los buenos resultados obtenidos en algunos modelos animales, es difícil reproducirlos en humanos. Existen distintas posibles razones para no encontrar un resultado positivo. Una de ellas es el diferente remodelado entre roedores, pequeños mamíferos y el hombre. Lo que hace que las dosis necesarias no sean las mismas. En seres humanos utilizamos dosis suprafisiológicas, miligramos frente a nanogramos, lo que además puede presentar un peligro ya que se han documentado patologías por exceso de BMP (fibrodisplasia osificante progresiva) (164).

Otra explicación posible, es el hecho de que dosis excesivamente altas promuevan una activación de los inhibidores de las BMP (noggin o escierostina)

Por otra parte no está muy claro, cuál de todas las BMP es la ideal. Es muy posible que el mayor efecto se consiga con una combinación de varias de ellas. Hecho que es difícil en humanos, por las patentes existentes (165).

También queda por definir cuál es el soporte más adecuado para conseguir el mayor efecto al aplicar las BMP

Grupo OHAp-Fn frente a grupo Control y grupo OHAp.

Ante la ausencia de resultados concluyentes, en los estudios clínicos con BMP y PRP, nos decidimos a utilizar una solución alternativa. Esta consistiría en intentar controlar los procesos de adhesión que ocurren entre el material y las células del huésped. En la mayoría de los casos, las células se adhieren y reconocen a los materiales sintéticos a

través de las integrinas. Las integrinas son una familia de receptores transmembrana que intervienen en los procesos de anclaje y transducción de señales, regulando la supervivencia celular, regulación y diferenciación. Una de las nuevas estrategias en biomateriales consiste en la utilización de estos receptores sobre distintos materiales para dirigir y controlar distintos procesos como la regeneración ósea.

La secuencia RGD identificada hace 18 años por Pierschbacher y Roushlahti (166) en la, es la secuencia más conocida y con una mayor efectividad en la adhesión celular sobre superficies sintéticas. Esta secuencia no sólo ha demostrado efectividad en el anclaje de distintas moléculas sino también en la embriogénesis, respuesta inmune o cicatrización.

Nuestro trabajo se apoya en estudios como los de Petrie et al (167) en los que analizan la osteointegración de implantes de titanio.

En este caso comparan de manera in vitro e in vivo, los efectos:

- Titanio,
- Titanio recubierto por biomaterial (Poli oligo ethilenglycol metacrilato)-In vivo
- Titanio recubierto por secuencias RGD inespecíficas.
- Titanio recubierto por una secuencia específica RGD ($\alpha 5\beta 1$)

La hipótesis que manejan en este trabajo se basa en el hecho de que no todas las integrinas promueven de la misma forma la diferenciación osteoblástica, y por tanto en último término la integración del implante. En estudios previos, achacan los efectos marginales de las secuencias RGD en la regeneración ósea al tipo de integrina ($\alpha 5\beta 1$ Vs $\alpha v\beta 3$). Para ello utilizan un fragmento de (FN III) que contiene la integrina $\alpha 5\beta 1$, expresado en E. Coli y purificado posteriormente.

Para el análisis in vitro, analizan a 7 días mediante PCR la expresión de los osteoblastos a partir de la transcripción de RUNX 2. Determinando un incremento estadísticamente significativo para la integrina específica frente a las secuencias inespecíficas de RGD $p < 0,03$. Los niveles de RUNX 2 son superiores para las secuencias inespecíficas frente al Titanio aislado (sin significación estadística). Los marcadores de actividad osteoblástica tardía como la sialoproteína ósea o la fosfatasa alcalina, son también superiores para la secuencia específica frente a la secuencia RGD inespecífica y frente al titanio ($p < 0,03$).

En cuanto a la mineralización de la matriz, se evidenció una mayor concentración de Ca^{2+} en la secuencia específica frente a las otras dos muestras con una significación estadística.

Los estudios in vivo, comparan el titanio con el biomaterial, secuencia RGD inespecífica y la secuencia RGD (muestras con distinta concentración de la integrina), mediante análisis histológico y biomecánicos. Se implantaron los tornillos de titanio en la tibia de ratas y se analizaron a las 4 semanas.

Los resultados evidencian una mayor superficie de contacto entre el titano y la secuencia específica (FN III) frente al resto de posibilidades, sin tejido fibroso o reacciones inflamatorias. La fijación en el estudio biomecánico era superior también en el caso de FN III frente al resto con significación estadística.

Los mejores resultados se observaban en muestras con mayores concentraciones de FN III llegando a un límite de saturación a elevadas densidades (relación hiperbólica).

Por tanto en dicho estudio concluyen que los pobres resultados obtenidos en otros estudios se deben a no haber controlado las características de las integrinas encargadas de controlar el proceso de adhesión y señalización, ya que por ejemplo,

integrinas como $\alpha\beta3$, promovida de manera primaria por secuencias RGD inespecíficas favorecen la reabsorción ósea ($\alpha\beta3$ presente en los podosomas de las zonas de reabsorción) frente a la actividad osteoblástica.

Nosotros consideramos que controlando las características del material (Hidroxiapatita) tamaño de cristal, superficie específica y tamaño de partícula podemos controlar la conformación que adquieren las proteínas que aportamos junto a él.

No existe ningún único parámetro que estudiado por separado puede predecir el comportamiento de un material dentro del organismo. Para poder aproximarnos a una predicción razonable, hicimos un estudio combinado.

La respuesta previsible si este material entra en contacto con un tejido receptor, sería la adsorción de altas cantidades de proteínas. Para conseguir una mayor estabilidad hemos añadido la proteína previo a su inserción en el organismo, controlando así sus efectos. El Fibrinógeno se adsorberá en conformación *end-on*. En esta conformación el Fibrinogeno tiene el dominio proinflamatorio desactivado pero el dominio RGD libre, lo que favorecerá la adhesión de células osteogénicas y promoverá la integración del material en el hueso.

En nuestro estudio utilizamos la muestra que presenta unas características más propicias para la adhesión de la, tras realizar el estudio de imagen observamos como en el análisis independiente del tiempo, mejoran ostensiblemente los parámetros que definen la morfometría del hueso trabecular frente a los Controles y a las muestras con Hidroxiapatita. Con una significación estadística $p=0,16$ para el grosor trabecular, que para tratarse de una muestra biológica y debido al bajo número de muestras

analizadas tiene un valor importante. Aunque sin significación estadística observamos una reducción del espacio trabecular. Sin embargo no se observan mejoras significativas en la densidad mineral ósea, de manera global en toda la pieza analizada. Aunque en el estudio de Petrie et al (167), determinan mayor presencia de Ca^{2+} a los 7 días, nosotros a los 5 días no evidenciamos hueso nuevo, probablemente la mejora del valor del grosor trabecular y el descenso de la separación es debido a la presencia de una mayor cantidad de tejido conectivo. Se podría pensar que también es debido al material, ya que el micro-CT no discrimina entre el material y el tejido óseo, sin embargo los cambios son más llamativos en las muestras que incorporan la proteína, lo que indica que la tiene un efecto en el proceso de remodelado.

En cuanto al análisis en función del tiempo, se evidencia en algunas variables, aquellas que hacen referencia a la morfología trabecular un descenso a las 48 horas para aumentar a los 5 días, permaneciendo los valores próximos a los iniciales. Este hecho puede ser debido a una redistribución del material a lo largo del tiempo, compensado este efecto a los 5 días con el aumento del tejido conectivo y la celularidad.

En cuanto a las variables BMD y BVF, no observamos cambios importantes con el tiempo, lógico ya que no hay incremento del depósito de tejido óseo. Sin embargo es un dato positivo, ya que en estudios semejantes como el de Larsson de 2012 (110), presenta un efecto paradójico en el que el nivel de BMD es menor para las muestras con material frente a los controles.

También realizamos un análisis comparativo de distintas zonas de la misma muestra (zona de implantación frente a una zona alejada) para determinar los efectos del biomaterial sobre el tornillo, si mejora o no la fijación, ya que a tiempos tan cortos es difícil observar modificaciones en zonas no tan próximas a la de implantación. De esta

manera además conseguimos que la misma muestra sea su propio control, y para determinar si los datos son homogéneos analizamos varias zonas en torno al implante. Las diferencias más significativas entre la muestra con Proteína (OHAp-Fn) con respecto a los Controles y la Hidroxiapatita (OHAp), se observan al comparar la zona próxima al implante y la zona alejada de éste, para las variables TbSp y TbTh con $p < 0,01$ y $p < 0,05$ respectivamente. Estos datos coinciden con el análisis histológico de las muestras, ya que evidenciamos un aumento de la celularidad, no inflamatoria, y del tejido conectivo desde las primeras 24 horas.

En cuanto a los valores de las distintas zonas en torno al implante, en el caso de la variable TbTh, es mayor para la zona inferior frente a las zonas derecha o izquierda del tornillo probablemente por la acumulación del material. La variable TbSp presenta valores muy semejantes independientemente de si se mide a la derecha, izquierda o debajo del implante.

En cuanto a las variables que definen la densidad mineral ósea, en el caso del BMD, no se observan diferencias significativas con ninguna de las muestras analizadas, y sin grandes diferencias entre las distintas áreas analizadas, con valores inferiores para las zonas más alejadas. En cuanto a la variable BVF, observamos un hecho paradójico y es el hecho de que este valor es mayor para las zonas alejadas frente a las próximas, aunque estas diferencias carecen de significación estadística.

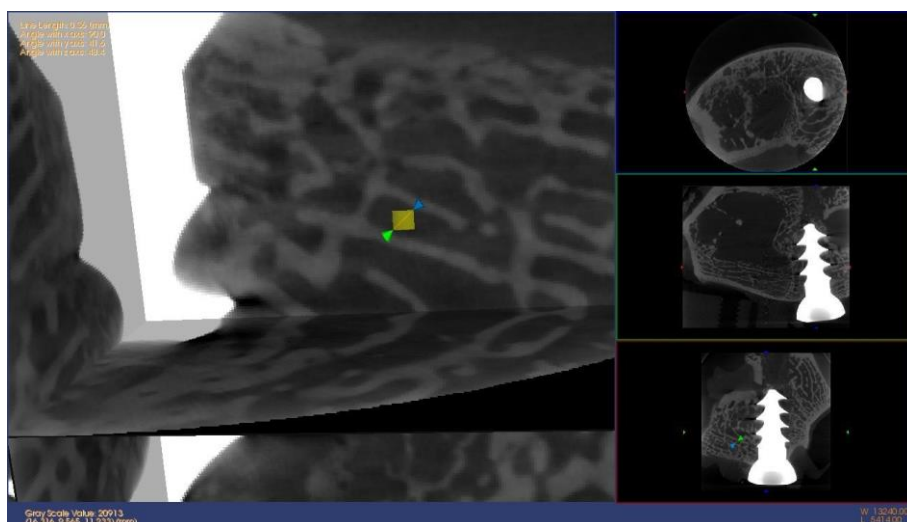


Fig. 8.1 Medición del grosor trabecular en el micro CT.

La razón parece residir en la zona elegida para el análisis. Si elegimos una zona trabecular próxima a la cortical el valor de BVF será superior, frente a si elegimos una zona de hueso trabecular próximo al espacio medular. En el caso de las zonas alejadas hay un mayor número de muestras cercanas al primer supuesto

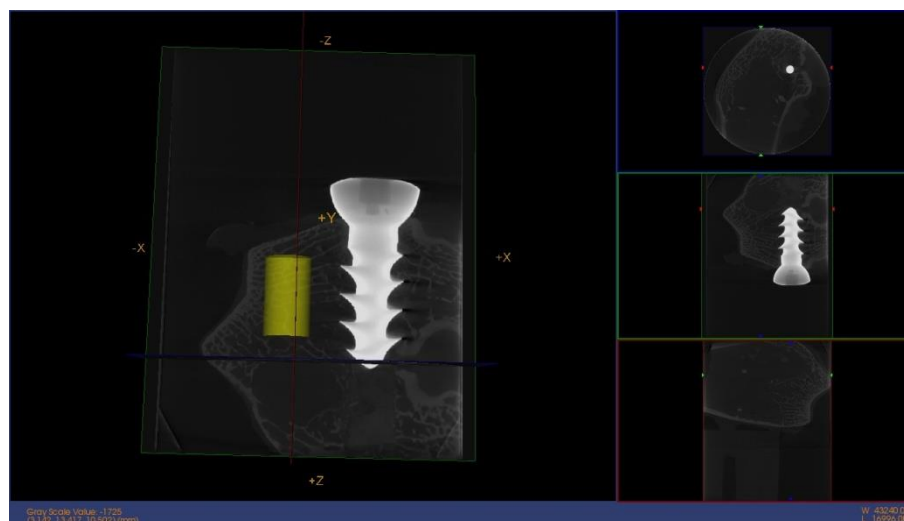


Fig.8.2. Zona alejada del tornillo analizada (en amarillo) por micro-CT.

Podemos confirmar estas conclusiones con los datos aportados con la Histología,

evidenciando mayores niveles de celularidad y de tejido conectivo a los 5 días en las muestras OHAp-Fn. Observando en algunas muestras como la número 33 (48h) un importante contacto entre el tornillo y el hueso, sin perder de vista el hecho de que en ocasiones, la zona de implantación del tornillo pueda influir en el mejor contacto del implante y en unos efectos diferentes dependiendo de si el tornillo se coloca más en zona de hueso cortical, trabecular o medular (145). La zona de implantación también es un factor importante a la hora de determinar el grado de inflamación, que aunque no es importante en nuestro estudio, si evidenciamos una mayor respuesta inflamatoria cuando el final del tornillo penetra en zona medular (muestra 17 5 días) Aunque con notables diferencias en cuanto a los tiempos analizados, en estudios en los que analizan los efectos de los BMP en ovejas y ratas en modelos de artrodesis vertebral (168, 169) a tiempos mucho más largos, 2 y 6 meses, y 21 días respectivamente, evidencian presencia de hueso neoformado en las zonas más próximas a la zona de inyección del material sin poder determinar un incremento global de la densidad mineral ósea en toda la vertebra.

En el primero de los estudios realizados en ovejas, las mediciones del BMD se realizaron con densitómetro, sin ser capaces de determinar un aumento de la densidad mineral ósea global, y achacando estos resultados al bajo número de animales analizados por grupo, cuatro.

Nos decidimos por aportar el material no a través del implante, sino como un cemento por la ventajas que en cuanto al coste y los efectos sobre la fractura podemos aportar.

En cuanto al primer punto los materiales de osteosíntesis recubiertos con biomateriales son más caros y difíciles de fabricar que los convencionales. Una de las posibles formas de aplicación de estos biomateriales es a demanda, en función de las

características del hueso. Existen sistemas que nos permiten medir el esfuerzo máximo de torsión del tornillo, acoplados a placas bloqueadas, adelantándonos a aquellas situaciones en las que la calidad del hueso es tan deficiente que a pesar del sistema de bloqueo, problemas como el “*cut out*”, es probable. En estos estudios se introduce el medidor previamente al brocado, a través de las camisas del mango de la placa y tras hacer un giro de 120º en el hueso subcondral nos determina el esfuerzo de torsión máximo (170). La fiabilidad de este método es alta ya que han conseguido correlacionar el mayor o menor esfuerzo de torsión del tornillo con la densidad mineral ósea medido con TAC.

Por tanto podemos aprovechar métodos de medición como el anterior, para predecir cuándo pueden fallar los tornillos con más facilidad y utilizar métodos de aumento como nuestro biomaterial, para completar la osteosíntesis. Además el hecho de que se aplica en forma líquida y no adherido al tornillo, permite su migración a través de las trabéculas, consiguiendo no sólo aumentar la fijación del tornillo, sino además ejerciendo su influencia sobre el proceso de consolidación de la fractura.

Por tanto y a pesar de las limitaciones de nuestro estudio (número de muestras analizadas) podemos concluir que los resultados son muy prometedores. Aunque no hayamos podido evidenciar neoformación ósea, si que objetivamos un aumento de la celularidad desde las primeras 24 horas, junto con una mejora de las variables del hueso trabecular probablemente debido a la acción de las secuencias RGD de la, que unen a osteoblastos y osteoclastos con el material en la zona de implantación promoviendo la remodelación ósea, y con ello mejorando la fijación del tornillo y

probablemente acortando los tiempos de consolidación ósea. Hechos que deberán ser comprobados con estudios semejantes a intervalos de tiempo superiores.

Además hemos comprobado la biocompatibilidad del material, y al tener un coste muy inferior al de otros materiales osteoinductores como las BMPs, permiten que su uso sea más generalizado, reservando éstas últimas para situaciones de retardos de consolidación o defectos óseos importantes.

7. Conclusiones

Una vez revisada la bibliografía y los resultados, para las condiciones de este estudio

nos atrevemos a formular las siguientes conclusiones:

- En cuanto a nuestro objetivo principal:
 - Se ha conseguido crear un material que es biocompatible. No se observan procesos deletéreos que puedan comprometer la formación de hueso. La cantidad de células inflamatorias observadas en el análisis histológico de las muestras con material, no difiere de la encontrada en los controles.
 - En el análisis por imagen, observamos una mejora en los parámetros que hacen referencia a la estructura del hueso trabecular (grosor trabecular y separación trabecular) en las muestras con proteína (OHAp-Fn), con respecto a los controles y a OHAp. No llega a alcanzar significación estadística cuando realizamos un análisis completo de la pieza, pero sí observamos una tendencia muy significativa y un valor de p próximo a la significación para muestras biológicas y análisis no paramétricos. Significación que si hallamos en las muestras OHAp-Fn cuando realizamos un análisis comparativo entre las zonas próximas al implante y una alejada del mismo.
 - El análisis histológico muestra una mayor presencia de células de carácter no inflamatorio y de tejido conectivo desde las primeras 24

horas en las muestras con (OHAp-Fn) con respecto a las muestras con hidroxiapatita exclusivamente (OHAp) y los controles.

- Por tanto podemos concluir que hemos conseguido un material biocompatible, aplicable, apto para su uso con material de osteosíntesis, con un coste muy competitivo frente a otros ya comercializados como los BMP. Necesitamos estudios a medio-largo plazo para demostrar la formación de nuevo hueso, sin embargo con el presente trabajo hemos obtenido unos resultados muy prometedores
- El modelo experimental en conejo, para el estudio de la fijación en fractura osteoporótica, es un modelo adecuado por su coste, estructura ósea comparable y disponibilidad.
- El protocolo de osteoporosis, ha demostrado ser efectivo (reducción de la densidad mineral ósea medido con micro-CT), reproducible y con una morbi mortalidad muy baja para el animal.
- La histología sigue siendo un factor determinante en el análisis de las muestras. Aunque el micro-CT aporta información rápida y precisa de la estructura ósea, el análisis histológico nos aporta información acerca del tipo celular o del tejido presente, siendo ambos estudios complementarios en la evaluación de nuestro material.

8. Bibliografía

1. Sobotta J, Welsch U. Histología. Ed Médica Panamericana, 2ª Edición. 2009
2. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. Clinical journal of the American Society of Nephrology. 2008; 3: S131-S9
3. Gehron P, Fedarko NS, Hefferan TE, Bianco P, Vetter UK, Grzesik W et al. structure and molecular regulation of bone matrix proteins. J Bone Miner Res 1993; 8:483-7
4. Canalis E, Economides AN, Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. Endocr Rev 2003; 24:218-35.
5. Syed AA, Agarwall M, Giannoudis PV, et al. Distal femoral fractures: long term outcome following stabilization with the LISS. Injury. 2004 35:599-607.
6. Sterck JG, Klei-Nulend J, Lips P, Burger EH. Response of normal and osteoporotic human bone cells to mechanical stress in vitro. Am J Physiol. 1998 274: E1113-20.
7. Hagiwara H, Inoue N, Matsuzaki H, et al. Relationship between structural anisotropy of the vertebral body and bone mineral density. Trans Orthop Res Soc. 2000 25:738
8. Boskey AL, Dicarlo E, Paschalis E, et al. Comparison of mineral quality and quantity in iliac crest biopsies from high-and low turnover osteoporosis: an FT-IR microspectroscopic investigation. Osteoporos INT. 2005 16: 2031-8.

9. Boivin GY, Chavassieux PM, Santora AC. Alendronate increases bone strength by increasing the mean degree of mineralization of bone tissue in osteoporotic women. *Bone* 2000 27:687-694.
10. Bailey AJ, Sims TJ, Ebbesen EN et al. Age-related changes in the biomechanical properties of human cancellous bone collagen: relationship to bone strength. *Calcif Tissue INT.* 1999. 65:203-10.
11. Mosekilde L. Age related changes in bone mass, structyre, and strength-effects of loading. *Z Rheumatol.* 2000 59 Suppll 1:1-9
12. Umberto T, Iolascon G, Gasbarra E, et al. Bone healing and osteoporosis. *Aging Clinical and Experimental Research.* Vol 23, Suppl to No 2.
13. Shapiro F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur Cell Mater* 2008; 15:53-76.
14. Park S-H, Silva M, Bahk W-J, Lieberman JR. Effect of repeated irrigation and debridement on fracture healing in an animal model. *J Orthop Res* 2002; 20: 1197-204.
15. Sigurdsem UE, Reikeras O, Utvag SE. External fixation compared to intramedullary nailing of tibial fractures in the rat. *ActaOrthop* 2009; 80: 375-9.
16. Giannoudis P, et al. Fracture healing in osteoporotic fractures: Is it really different? A basic science perspective. *Injury, Int. J. Care Injured.* 2007: 38S1, S90-S99.
17. Hill EL, Kraus K, Lapierre KP, et al. Ovariectomy impairs fracture healing after 21 days. *Trans Orthop Res Soc.* 1995; 20:230.

18. Nakumg-Matthai H, AAppleyard R, Jansen J, et al. Osteoporosis influences the early period of fracture healing in a rat osteoporotic model. *Bone*. 2001; 28:80-6.
19. Lill CA, Hessel J, Schegel U, et al. Biomechanical evaluation of healing in a non-critical defect in a large animal model of osteoporosis. *J Orthop Res*. 2003; 21: 836-842.
20. Cranney A, Tugwell P, Zytaruk N *et al*. Osteoporosis Methodology Group and the Osteoporosis Research Advisory Group. Meta-analyses of therapies for postmenopausal osteoporosis. IV. Meta-analysis of raloxifene for the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis. *Endocr Rev*, 23 (2002), pp. 524-528
21. R.A. Meyer Jr., P.J. Tsahakis, D.F. Martin. Age and ovariectomy impair both the normalization of mechanical properties and the accretion of mineral by the fracture callus in rats. *J Orthop Res*, 19 (2001), pp. 428-435.
22. M. Joldersma, J. Klein-Nulend, A.M. Oleksik *et al*. Estrogen enhances mechanical stress-induced prostaglandin production by bone cells from elderly women. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 280 (2001), pp. E436-E442.
23. G. D'Ippolito, P.C. Schiller, C. Ricordi. Age-related osteogenic potential of mesenchymal stromal stem cells from human vertebral bone marrow. *J Bone Miner Res*, 14 (1999), pp. 1115-1119.
24. P.J. Meunier, J. Aaron, C. Edouard, C. Vignon. Osteoporosis and the replacement of cell populations of the marrow by adipose tissue. *Clin Orthop Rel Res*, 80 (1971), pp. 147-154.

25. Stromsoe K. Fracture fixation problems in osteoporosis. *Injury, Int. J. Care Injured*. 2004; 35: 107-113.
26. Alhborg HG, Johnell O, Turner CH, Rannevik G, Karlsson MK. Bone loss and bone size after the menopause. *N Engl J Med*. 2003; 349: 327-34
27. Chinese Orthopaedic Association. Diagnosis and treatment of osteoporotic fractures. *OrthopSurg* 2009; 4: 251-7.
28. Tarantino U, Cerocchi I, Gasbarra E, et al. Osteosynthesis of fragility fractures. *Aging Clinical and Experimental Research*. Vol 23; Suppl. To No. 2.
29. Perren SM. Backgrounds of the technology of internal fixators. *Injury*. 2003; 34 S2: 1-3.
30. Giannoudis PV, Schneider E. Principles of fixation in osteoporotic fractures. *J Bone Joint Surg*. 2006; 88-8: 1272-8.
31. Miranda MA. Locking plate technology and its role in osteoporotic fractures. *Injury*. 2007; 3853: S35-9.
32. Parker MJ, Khan RKJ, Crawford J, Pryor GA. Hemiarthroplasty versus internal fixation for displaced intracapsular hip fractures in the elderly. *J Bone Joint Surg Br*. 2002; 84: 1150-5.
33. Kenneth A, Kubiak E, Fulkerson E, Kummer F, Koval K. Biomechanics of Locked Plates and Screws. *J Orthop Trauma*. 2004; 18: 488-493.
34. Cole PA, Zlowodzki M, Kregor PJ. Less Invasive Stabilization System (LISS) for fractures of the proximal tibia: indications, surgical technique and preliminary results of the UMC Clinical Trial. *Injury*. 2003;34(suppl 1): A16–A29.

35. Cordey J, Borgeaud M, Perren SM. Force transfer between the plate and the bone: relative importance of the bending stiffness of the screws friction between plate and bone. *Injury*. 2000; 31 (suppl 3):C21–C28.
36. Farouk O, Krettek C, Miclau T, et al. Minimally invasive plate osteosynthesis: does percutaneous plating disrupt femoral blood supply less than the traditional technique? *J Orthop Trauma*. 1999; 13: 401–406.
37. Gautier E, Sommer C. Guidelines for the clinical application of the LCP. *Injury*. 2003; 34 (suppl 2):B63–B76.
38. Perren SM. Evolution and rationale of locked internal fixator technology. Introductory remarks. *Injury*. 2001 ;32 (suppl 2): B3–B9.
39. Henderson C, Fitzpatrick D, Marsh L, et al. Healing complications are common after locked plating for distal femur fractures. *ClinOrthopRelat Res*. 2011; 469: 1757.1765.
40. Bonnaire F. Straßberger C. Kieb M. Bula P.Osteoporotische Frakturen des proximalen Femurs. Was gibt es Neues? *Chirurg*. 2012; 83: 882–891
41. Roerdink W, Aalsma A, Nijenbanning G et al. Initial promising results of the dynamic locking blade plate, a new implant for the fixation of intracapsular hip fractures: results of a pilot study. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2011; 131: 519–524.
42. Parker MJ, Handoll HH. Gamma and other cephalocondylic intramedullary nails vs. extramedullary implants for extracapsular hip fractures in adults. *Cochrane*. 2010. Database Syst Rev:CD000093

43. Erhart S, Schmoelz W, Blauth M et al. Biomechanical effect of bone cement augmentation on rotational stability and pull-out. Strength of the Proximal Femur Nail Antirotation™. Injury. 2011; 42: 1322–1327.
44. Haidukewych GJ, Israel T, Berry D. Reverse obliquity fractures of the intertrochanteric region of the femur. J Bone Joint Surg Am. 2001; 83-A: 643–650.
45. Baumgaertner MR, Curtin SL, Lindskog DM et al. The value of the tip-apex distance in predicting failure of fixation of peritrochanteric fractures of the hip. J Bone Joint Surg Am. 1995; 77: 1058–1064.
46. Baumgaertner MR, et al. Intramedullary Vsextramedullary fixation for intertrochanteric hip fracture. ClinOrthop. 1998; 348: 87-94.
47. Cooper C, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Melton LJ 3rd: Incidence of clinically diagnosed vertebral fractures: a population-based study in Rochester, Minnesota, 1985-1989. J Bone Miner Res.1992; 7: 221-227.
48. OsteoporotischeFrakturen des Achsenskeletts. Praxis 2012; 101 (16): 1021–1030.
49. Edidin AA, Ong KL, Lau E Kurtz SM: Mortality risk for operated and non operated vertebral fracture patients in the medicare population. J BoneMiner Res 2011; 26: 1617-1626.
50. Heini PF. The current treatment – a survey of osteoporotic fracture treatment.Osteoporotic spine fractures: the spine surgeon's perspective. OsteoporosInt 2005; Suppl 2: S85-92.

51. Galibert P, Deramond H, Rosat P, Le Gars D. Preliminary note on the treatment of vertebral angioma by percutaneous acrylic vertebroplasty. *Neurochirurgie*. 1987; 33: 166-168.
52. Laredo JD, Bellaiche L, Hamze B, Naouri JF, Bondeville JM, Tubiana JM: Current status of musculoskeletal interventional radiology. *Radiol Clin North Am* 1994; 32: 377-398.
53. Lieberman IH, Dudeney S, Reinhardt MK, Bell G. Initial outcome and efficacy of «kyphoplasty» in the treatment of painful osteoporotic vertebral compression fractures. *Spine* 2001; 26: 1631-1638.
54. Trumm CG, Jakobs TF, Zech CJ, Weber C, Reiser MF, Hoffmann RT. Vertebroplasty in the treatment of back pain. *Radiologe* 2006; 46:495-505.
55. Hoffmann RT, Jakobs TF, Wallnöfer A, Reiser MF, Helmberger TK. Percutaneous vertebroplasty (pv): indications, contraindications, and technique. *Radiologe* 2003; 43: 709-717.
56. McGraw JK, Cardella J, Barr JD, Mathis JM, Sanchez O, Schwartzberg MS, et al. Society of Interventional Radiology quality improvement guidelines for percutaneous vertebroplasty. *J Vasc Interv Radiol*. 2003; 14: S311-315.
57. Nussbaum DA, Gailloud P, Murphy K. A review of complications associated with vertebroplasty and kyphoplasty as reported to the Food and Drug Administration medical device related web site. *J Vasc Interv Radiol*. 2004; 15: 1185-1192.
58. Lee BJ, Lee SR, Yoo TY. Paraplegia as a complication of percutaneous vertebroplasty with polymethylmethacrylate: a case report. *Spine*. 2002; 27: E419-422.

59. Berlemann U, Ferguson SJ, Nolte LP, Heini PF. Adjacent vertebral failure after vertebroplasty. A biomechanical investigation. J Bone Joint. Surg Br 2002; 84: 748-752.
60. Voormolen MH, Lohle PN, Lampmann LE, van den Wildenberg W, Juttman JR, Diekerhof CH, et al. Prospective clinical follow-up after percutaneous vertebroplasty in patients with painful osteoporotic vertebral compression fractures. J VascIntervRadiol 2006; 17: 1313-1320.
61. Neer C. Displaced proximal humerus fractures. Part I Classification and evaluation. J Bone Joint Surg Am. 1970; 52:1077–1089.
62. Ruedi T, Buckley R, Moran C (Hrsg) 2008. AO-Prinzipien des Frakturmanagements. Thieme, Stuttgart.
63. Hertel R. Fractures of the proximal humerus in osteoporotic bone. Osteoporos Int. 2005. 16 (Suppl. 2):65–72.
64. Krettek C, Wiebking U (2011) Proximale Humerus fraktur: Ist die winkel stabile Platten osteosynthese der konservativen Behandl ungüberlegen? Unfallchirurg 114:1059–1067.
65. Hanson B, Neidenbach P, Boer P et al. Functional outcomes after non operative management of fractures of the proximal humerus. J Shoulder Elbow Surg. 2009; 18:612–62.
66. Torrens C, Corrales M, Vilà G et al. Functional and quality-of-life results of displaced and non displaced proximal humeral fractures treated conservatively. J Orthop Trauma. 2011; 25:581–587.

67. Platzer P, Thalhammer G, Oberleitner G et al. Displaced fractures of the greater tuberosity: a comparison of operative and non operative treatment. J Trauma. 2008; 65:843–848.
68. Lill H, Ellwein A, Katthagen C, Voigt C. Osteoporotic fractures of the proximal humerus. Chirurg. 2012 Oct; 83(10):858-65.
69. Lanting B, MacDermid J, Drosdowech D et al. Proximal humeral fractures: a systematic review of treatment modalities. J Shoulder Elbow Surg . 2008; 17:42–54.
70. Lill H, Katthagen C, Hertel A et al. All-arthroscopic intramedullary nailing of 2- and 3-part proximal humeral fractures: a new arthroscopic technique and preliminary results. Arch Orthop Trauma Surg. 2012; 132:641–647.
71. Gardner M, Weil Y, Baker J et al. The importance of medial support in locked plating of proximal humerus fractures. J Orthop Trauma. 2007; 21:185–191.
72. Krappinger D, Bizzotto N, Riedmann S et al. Predicting failure after surgical fixation of proximal humerus fractures. Injury 2011. 42:1283–1288.
73. Hepp P, Theopold J, Osterhoff G et al. Bone quality measured by the radiogrammetric parameter “cortical index” and reoperations after locking plate osteosynthesis in patients sustaining proximal humerus fractures. Arch Orthop Trauma Surg. 2009; 129:1251–1259.
74. Voigt C, Lill H. Innovationen und Prognose. Unfallchirurg. 2011; 114: 1083–1090.

75. Reuther F, Mühlhäusler B, Wahl D et al. Functional outcome of shoulder hemiarthroplasty for fractures: a multicentre analysis. *Injury*. 2010; 41:606–612.
76. Meiners J, Jürgens C, Mägerlein S, Wallstabe S, Kienast B, Faschingbauer M. Osteoporotic fractures of the distal radius. What is new? *Chirurg* 2012 · 83:892–896.
77. Handoll HHG, Madhok R. Conservative interventions for treating distal radial fractures in adults. *Cochrane 2003 Database Syst Rev*:CD000314.
78. Handoll HHG, Vaghela MV, Madhok R. Percutaneous pinning for treating distal radial fractures in adults. *Cochrane 2007 Database Syst Rev (Online)*: CD 006080.
79. Siebert H, Klönz A. Distal radial fracture. *Unfallchirurg* 2005 108:135–153.
80. Handoll HHG, Huntley JS, Madhok R. Different methods of external fixation for treating distal radius fracture in adults. *Cochrane 2008. Database Syst Rev (Online)*: CD 006522
81. Handoll HHG, Huntley JS, Madhok R. External fixation versus conservative treatment for distal radius fracture in adults. *Cochrane 2007. Database Syst Rev (Online)*:CD 006194.
82. Figl M, Weninger P, Jurkowitsch J. Unstable distal radius fracture in the elderly patient-volar fixed-angle plate osteosynthesis prevents secondary loss of reduction. *J Trauma* 2010. 68:992–998.
83. Konstantinidis I, Helwig P, Strohm PC. Clinical und radiological outcome after stabilization of complex intra-articular fractures of the distal radius with the volar 2,4 mm LCP. *Arch Orthop Trauma Surg* 2009. 130:751–757.

84. Voigt C, Lill H. What advantages does volar plate fixation have over K-wire fixation for distal radius extension fractures in the elderly? *Unfallchirurg* 2006; 109:845–846, 848–854.
85. Gradl G, Wendt M, Gierer P et al. Intramedullary nailing for distal radial fracture. *Trauma Berufskrankheit* 2008 241–244.
86. Williams DF. *The Williams Dictionary of Biomaterials*. Liverpool University press.1999.
87. Sastre R, De Aza S, San Román J. *Biomateriales*. Ed CYTED. 2004.
88. Ginebra MP, Espanol M, Montufar EB, Perez RA, Mestres G. New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. *ActaBiomaterialia*. 2010; 6: 2863- 73.
89. Driessens FC, Fernández E, Ginebra MP, Boltong MG, Planell JA. Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements. *Anales de Química*. 1997; 93: S38-S43.
90. Low KL, Tan SH, Zein SHS, Roether JA, Mouriño V, Boccaccini AR. Calcium phosphate-based composites as injectable bone substitute materials. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2010; 94B (1): 273-86.
91. Takagi S, Chow LC. Formation of macropores in calcium phosphate cement implants. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2001; 12 (2): 135-9.
92. Cummings SR, Melton LJ. Epidemiology and outcomes of osteoporotic fractures. *Lancet* 2002; 359:1761–7.

93. Kanis JA, Johnell O, Oden A, et al. Ten year probabilities of osteoporotic fractures according to BMD and diagnostic thresholds. *OsteoporosInt* 2001; 12:989–95.
94. El futuro de los biomateriales. Tendencias tecnológicas a medio y largo plazo. Fundación OPTI. 2004
95. Moraleda BF-M, Román JS, Rodríguez- Lorenzo LM. Influence of surface features of hydroxyapatite on the adsorption of proteins relevant to bone regeneration. *J Biomed Mater Res Part A* 2013.
96. Egermann M, Goldhahn J, Scheneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporosis Int.* 2005; 16: S129-S138.
97. Baofeng L, Zhi Y, Bei CH, Jian L. Characterization of a rabbit osteoporosis model induced by ovariectomy and glucocorticoid. *Acta Orthopaedica* 2010; 81 (3): 396-401.
98. Castañeda S, Calvo E, Gonzalez-Gonzalez R, de la Piedra C, Diaz-Curiel M, Herrero- Beaumont G. Characterization of a new experimental model of osteoporosis in rabbits. *J Bone Miner Metab.* 2008; 26: 53-59.
99. Brodbelt DC, Pfeiffer DU, Young LE, Wood JL. Results of the confidential enquiry into perioperative small animal fatalities regarding risk factors for anesthetic-related death in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2008 Oct 1;233(7):1096-104.
100. Bouxsein ML, Boyd SK, Christiansen BA, Guldberg RE, Jepsen K, Muller R. Guidelines for assessment of bone microstructure in rodents using micro-computered tomography. *J Bone Miner Research.* 2010; 25 (7): 1468-1486
101. Rusell T Turner. Animals models for osteoporosis. *Reviews in endocrine and metabolic disorders* 2001; 2:117-127.

102. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. E Scheneider. Osteoporos Int 2005 16: S129-S138.
103. Keaveany TM, Morgan EF, Niebur GL, Yeh OC (2001) Biomechanics of trabecular bone. Annu Rev Biomed Eng 3:307-333.
104. Pavlos P Lelovas, Theodoros T Xanthos, Sofia E Thoma, George P Lyritis, Ismene A Dontas .The Laboratory Rat as an Animal Model for Osteoporosis Research. Comp Med. 2008 October; 58(5): 424–430.
105. Newman E, Turner AS, Wark JD (1195) The potential of sheep for the study of osteopenia: current status an comparison with other animal model. Bone 16:277S-284S.
106. Cao T, Shiota T, Ohno K, Michi KI (2004) Mineralized bone loss in partially edentulous trabeculae of ovariectomized rabbits. Clin Oral Implants Res 39:37-41.
107. Gilsanz V, Roe Tf, Gibbens DT, Schulz EE, Carlson ME, Gonzalez O (1988) effect of sex steroids on peak bone density of growing rabbits. Am J PhysiolEndocrinolMetab 255:E 416-E421.
108. Brockstedt H, Kassem M EriksenEF, MelsenF. Age and sex related changes in iliac cortical bone mass and remodeling. Bone 14:681-691.
109. Vincent A Stadelmann Dominique P Pioletti. Calcium phosphate cement augmentation of cancellous bone screws can compensate for the absence of cortical fixation. Journal of Biomechanics 43 (2010) 2869-2874.
110. S.Larsson ,V.A.Stadelmann , J.Arnoldi, M.Behrens , B.Hess , P.Procter , M. Murphy , D.P.Pioletti Injectable calcium phosphate cement for augmentation around cancellous bone screws.In vivo biomechanical studies. Journal of Biomechanics 2012.Apr 30;45(7):1156-60.

111. Changli Jiang et al. Effects of glucocorticoid on BMD, micro-architecture and biomechanics of cancellous and cortical bone mass in OVX rabbits. *Medical Engineering and Physics* 34(2012)2-8.
112. Mueller, M.E., 1962. Die Verwendung von Kunstharzen in der Knochenchirurgie. *Archives of Orthopaedics Unfall-chir* 54, 513–522.
113. Enis, J.E., McCollough 3rd, N.C., Cooper, J.S., 1974. Effect of methylmethacrylate in osteosynthesis. *Clinical orthopaedics and related research* 105, 283–294.
114. Leeson, M.C., Lippitt, S.B., 1993. Thermal aspects of the use of polymethylmethacrylate in large metaphyseal defects in bone. A clinical review and laboratory study. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 295, 239–245.
115. Larsson, S., 2006. Cement augmentation in fracture treatment. *Scandinavian journal of surgery: SJS: official organ for the finnish surgical society and the scandinavian surgical society* 95 (2), 111–118.
116. Yi, X., Wang, Y., Lu, H., Li, C., Zhu, T., 2008. Augmentation of pedicle screw fixation strength using injectable calcium sulphate cement: An in vivo study. *Spine* 33 (23), 2503–2509.
117. Palin E, Liu HN, Webster TJ. Mimicking the nano features of bone increases bone-forming cell adhesion and proliferation. *Nanotechnology* 2005;16:1828–1835.
118. Rodriguez-Lorenzo LM. In: Preparation and applications of modulated surface energy biomaterials. Dumitriu S, Popa V, editors. *Polymeric Biomaterials*: CRC press; 2012.

119. Iafisco M, Palazzo B, Falini G, Di Foggia M, Bonora S, Nicolis S, Casella L, Roveri N. Adsorption and conformational change of myoglobin on biomimetic hydroxyapatite nanocrystals functionalized with alendronate. *Langmuir* 2008;24:4924–4930.
120. Ribeiro N, Sousa SR, Monteiro FJ. Influence of crystallite size of nanophased hydroxyapatite on fibronectin and osteonectin adsorption and on MC3T3-E1 osteoblast adhesion and morphology. *J Colloid InterfSci* 2010;351:398–406.
121. Rosen CJ. Building bones by knocking down genes. *Nat Med* 2012;18:202–204.
122. Liou SC, Chen SY, Liu DM. Synthesis and characterization of needlelike apatitic nanocomposite with controlled aspect ratios. *Biomaterials* 2003;24:3981–3988.
123. Gugutkov D, Altankov G, Hernandez JCR, Pradas MM, SanchezMS. Fibronectin activity on substrates with controlled AOH density. *J Biomed Materials Res A* 2010;92A:322–331.
124. Oyane A, Tsurushima H, Ito A. Highly efficient gene transfer system using a laminin-DNA-apatite composite layer. *J Gene Med* 2010;12:194–206.
125. Zhu XD, Zhang HJ, Li DX, Fan HS, Zhang XD. Study on the enhanced protein adsorption of microwave sintered hydroxyapatite nanoceramic particles: role of microstructure. *J Biomed Materials Res B* 2012;100B:516–523.
126. Roderer G, Erhardt J, Graf M, Kinzl L, Gebhard F. Clinical results for minimally invasive locked plating of proximal humerus fractures. *J Orthop Trauma* 2010;24:400–6.
127. Egol KA, Kubiak EN, Fulkerson E, et al. Biomechanics of locked plates and screws. *J Orthop Trauma*. 2004;18(8):488–93.

128. Stoffel K, Dieter U, Stachowiak G, et al. Biomechanical testing of the LCP—how can stability in locked internal fixators be controlled? *Injury*. 2003; 34Suppl 2:B11–9.
129. Clifford B. Jones. Augmentation of Implant Fixation in Osteoporotic Bone. *CurrOsteoporos Rep* (2012) 10:328–336.
130. S. Larsson, P. Procter. Optimising implant anchorage (augmentation) during fixation of osteoporotic fractures: Is there a role for bone-graft substitutes? *Injury, Int. J. Care Injured* 42 (2011) S72–S76.
131. Sanden B, Olerud C, Johansson C, Larsson S. Improved bone-screw interface with hydroxyapatite coating: an in vivo study of loaded pedicle screws in sheep. *Spine* 2001;26(24):2673–8.
132. Moroni A, Cadossi M, Romagnoli M, Faldini C, Giannini S. A biomechanical and histological analysis of standard versus hydroxyapatite-coated pins for external fixation. *J Biomed Mater Res B ApplBiomater* 2008;86B(2):417–21.
133. MoroniA, Orienti L, Stea S, Visentin M. Improvement of the bone-pin interface with hydroxyapatite coating: an in vivo long-term experimental study. *J Orthop Trauma* 1996;10(4):236–42.
134. Moroni A, Faldini C, Hoang-Kim A, Pegreff F, Giannini S. Alendronate improves screw fixation in osteoporotic bone. *J Bone Joint Surg Am* 2007;89(1):96–101.
135. Skoglund B, Holmertz J, Aspenberg P. Systemic and local ibandronate enhance screw fixation. *J Orthop Res* 2004;22(5):1108–13.
136. Muhr G, Tscherne H, Thomas R. Comminuted trochanteric femoral fractures in geriatric patients: the results of 231 cases treated with internal fixation and acrylic cement. *ClinOrthopRelat Res* 1979;1979(138):41–4.

137. Bartucci EJ, Gonzalez MH, Cooperman DR, Freedberg HI, Barmada R, Laros GS. The effect of adjunctive methylmethacrylate on failures of fixation and function in patients with intertrochanteric fractures and osteoporosis. *J Bone Joint Surg Am* 1985;67(7):1094–107.
138. Pfeifer BA, Krag MH, Johnson C. Repair of failed transpedicle screw fixation. A biomechanical study comparing polymethylmethacrylate, milled bone, and matchstick bone reconstruction. *Spine* 1994;19(3):350–3.
139. Kawagoe K, Saito M, Shibuya T, Nakashima T, Hino K, Yoshikawa H. Augmentation of cancellous screw fixation with hydroxyapatite composite resin (CAP) in vivo. *J Biomed Mater Res* 2000;53(6):678–84.
140. Hoshikawa A. Quantitative analysis of the resorption and osteoconduction process of a calcium phosphate cement and its mechanical effect for screw fixation. *Biomaterials*. 2003; 24 (27): 4967–4975.
141. Seong-Ho C. Osteoconductivity and biodegradation of synthetic bone substitutes with different tricalcium phosphate contents in rabbits. *Journal of biomedical materials research b: applied biomaterials*. 2013 vol b.
142. Sen MK, Miclau T. Autologous iliac crest bone graft: Should it still be the gold standard for treating nonunions?. *Injury, Int. J. Care Injured* (2007) 38S1, S75—S80.
143. Bigham A.S. Effects of combined hydroxyapatite and human platelet rich plasma on bone healing in rabbit model: radiological, macroscopical, histopathological and biomechanical evaluation. *Cell Tissue Bank*. 2012 13:639-651.

144. Batista MA. Comparison between the effects of platelet-rich plasma and bone marrow concentrate on defect consolidation in the rabbit tibia. *Clinics* 2011;66(10):1787-1792.
145. Hardouin P, Lu JX. Comparative study of tissue reactions to calcium phosphate ceramics among cancellous, cortical, and medullar bone sites in rabbits. *J Biomed Mater Res.* 1998 Dec 5;42(3):357-67.
146. Kassolis JD, Rosen PS, Reynolds MA. Alveolar ridge and sinus augmentation utilizing platelet-rich plasma in combination with freeze-dried bone allograft: case series. *J Periodontol*; 2000 71:1654–1661.
147. Robiony M, Polini F, Costa F, Politi M. Osteogenesis distraction and platelet-rich plasma for bone restoration of the severely atrophic mandible: preliminary results. *J Oral Maxillofac Surg* 2002 60:630–635.
148. Rodriguez A, Anastassov GE, Lee H, Buchbinder D, Wettan H. Maxillary sinus augmentation with deproteinated bovine bone and platelet rich plasma with simultaneous insertion of endosseous implants. *J Oral Maxillofac Surg* 2003 61:157–163.
149. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG. Investigation of platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002 Oct;60(10):1176-81.
150. Plachokova AS, et al .The early effect of platelet-rich plasma on bone healing. *Clin. Oral Impl. Res.* 2007;18 244–251.
151. Wiltfang J, et al. Effects of platelet-rich plasma on bone healing. *Clin. Oral Impl. Res.* 2004(15) 187–193.

152. Carreon LY, Glassman SD, Anekstein Y, et al. Platelet gel (AGF) fails to increase fusion rates in instrumented posterolateral fusions. *Spine*. 2005 30(9): E243–6; discussion E247.
153. Cook SD. Preclinical and clinical evaluation of osteogenic protein-1 (BMP-7) in bony sites. *Orthopedics*. 1999; 22:669–671.
154. Turgeman G, Zilberman Y, Zhou S, et al. Systemically administered rhBMP-2 promotes MSC activity and reverses bone and cartilage loss in osteopenic mice. *J Cell Biochem* 2002;86:461–74.
155. Simic P, Buljan-Culej J, Orlic I, et al. BMP-6 restores bone in osteoporotic aged rats and, unlike estradiol and PTH, restores trabecular bone in ovariectomized BMP-6 knockout mice. *ASBMR 27th Annual Meeting*. Nashville, TN: American Society for Bone and Mineral Research; 2005.
156. Phillips FM, Turner AS, Seim 3rd HB, et al. In vivo BMP-7 (OP-1) enhancement of osteoporotic vertebral bodies in an ovine model. *Spine J* 2006;6:500–6.
157. Lu J, Bhargav D, Wei AQ, Diwan A. Posterolateral intertransverse spinal fusion possible in osteoporotic rats with BMP-7 in a higher dose delivered on a composite carrier. *Spine* 2008;33:242–9.
158. Yoshida K, Sumita Y, Marukawa E, Harashima M, Asahina I. Effect of platelet-rich plasma on bone engineering with an alloplastic substitute containing BMP2. *Bio-Medical Materials and Engineering* 23 (2013) 163–172 163.
159. Johnson EE, Urist MR, Finerman GA. Bone morphogenetic protein augmentation grafting of resistant femoral nonunions A preliminary report. *Clin Orthop* 1988;230:257–65.

160. Kujala S, Raatikainen T, Ryhanen J, et al. Composite implant of native bovine bone morphogenetic protein (BMP) and biocoral in the treatment of scaphoid nonunions—a preliminary study. *Scand J Surg* 2002;91:186—90.
161. Kujala S, Raatikainen T, Ryhanen J, et al. Composite implant of native bovine bone morphogenetic protein (BMP), collagen carrier and biocoral in the treatment of resistant ulnar nonunions: report of five preliminary cases. *Arch Orthop Trauma Surg* 2004;124:26—30.
162. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, et al. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am* 2001;83-A(Suppl 1):S151—8.
163. Govender S, Csimma C, Genant HK, et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomised study of four hundred and fifty patients. *J Bone Joint Surg Am* 2002;84-A:2123—34.
164. Westerhuis RJ, van Bezooijen RL, Kloen P. Use of bone morphogenetic proteins in traumatology. *Injury, Int. J. Care Injured* (2005) 36, 1405—1412.
165. Giannoudis P, Tzioupis C. Clinical applications of BMP-7, The UK perspective. *Injury, Int. J. Care Injured* (2005) 36S, S47—S50.
166. Rouslahti E, Pierschbacher MD. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 1987; 238: 491-497.
167. Petrie T, Garcia AJ. The effect of integrin-specific bioactive coatings on tissue healing and implant osseointegration. *Biomaterials* 2009; 29: 2849-2857.

168. Jike Lu J, Bhargav D, Wei AQ, Diwan A. Posterolateral Intertransverse Spinal Fusion Possible in Osteoporotic Rats With BMP-7 in a Higher Dose Delivered on a Composite Carrier. *SPINE* 2008 Volume 33, Number 3, pp 242–249.
169. Phillips FM et al. In vivo BMP-7 (OP-1) enhancement of osteoporotic vertebral bodies in an ovine model. *The Spine Journal* 6 (2006) 500–506.
170. Roderer G, et al. Biomechanical in vitro assessment of screw augmentation in locked plating of proximal humerus fractures. *Injury, Int. J. Care Injured* 44 (2013) 1327–1332.

9. ANEXO DE RESULTADOS

RESULTADOS MICRO CT

A continuación se muestran los resultados completos del análisis por imagen:

- Análisis de las muestras
- Análisis detallado de las muestras :
 - Zona próxima al tornillo 1(derecha)
 - Zona próxima al tornillo 2(izquierda)
 - Zona inferior al tornillo
 - Zona alejada del tornillo

Análisis de las muestras

Control de 24h (10C)

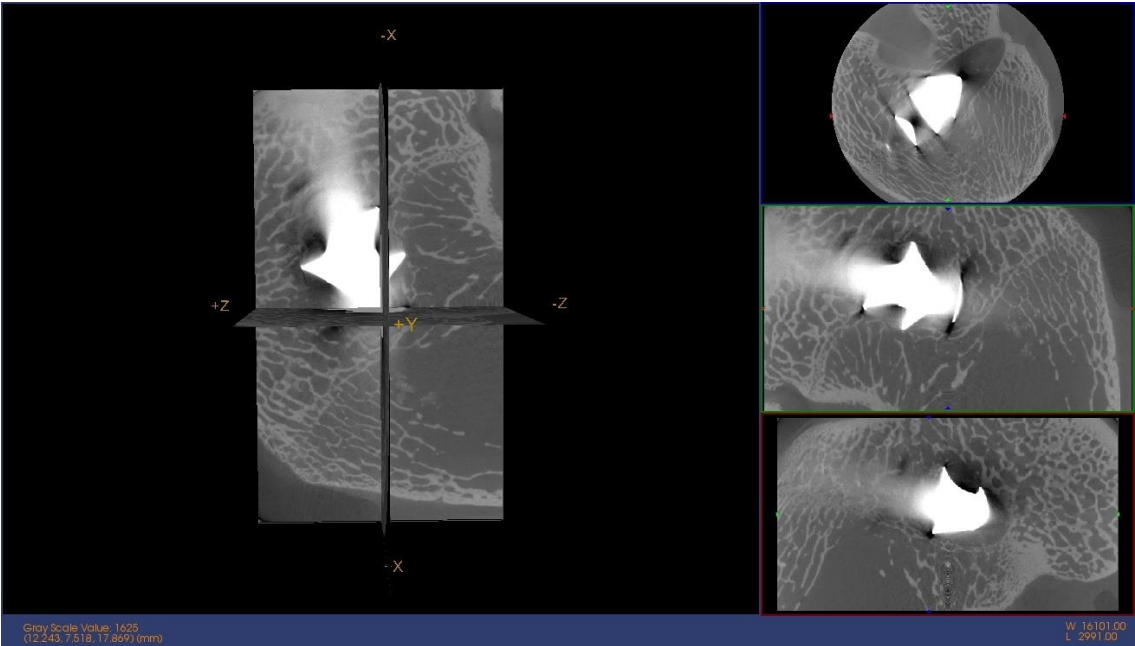


IMAGEN Micro CT

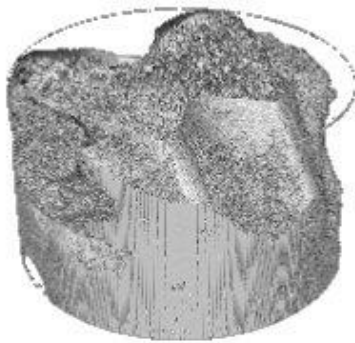


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 1241.7924	Std Dev: 1356.9008
Volumen (mm^3): 2233.1773	Volumen de Hueso (mm^3): 852.0651
Voxels: 60270470	BMC (mg) 490.2112
BMD (mg/cc): 214.4613	TMC (mg): 405.0929
TMD (mg/cc): 475.4248	BVF: 0.3815

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 11.30	Tb.Sp. 3D (pixels): 47.97
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0.376786	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0.8401

Control de 24h (11C)

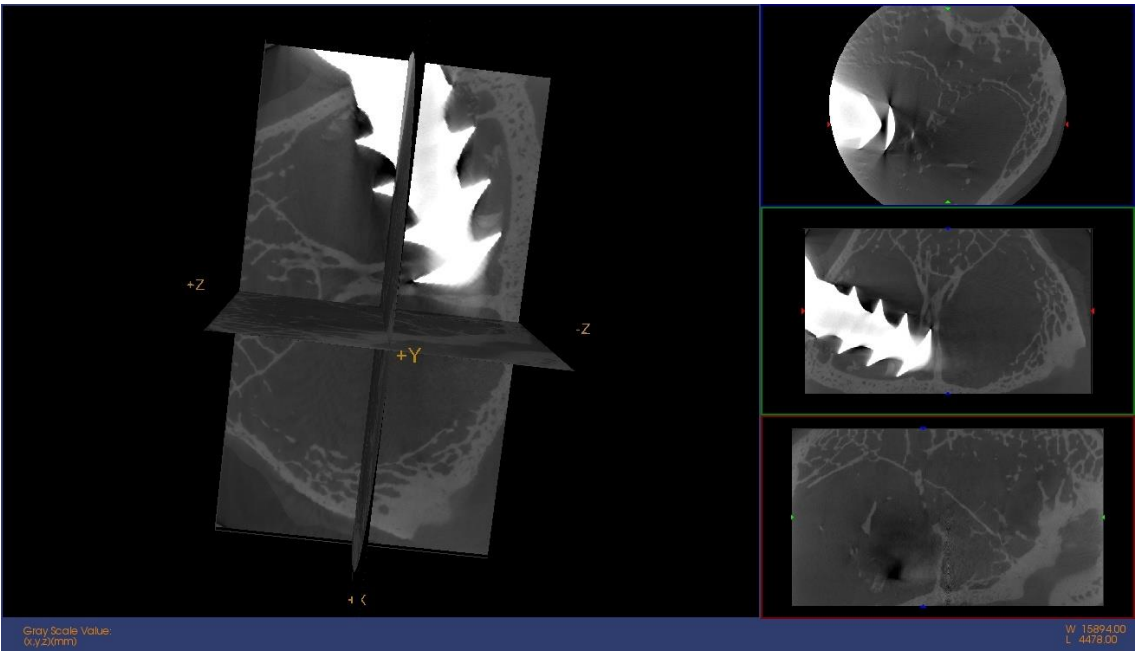


IMAGEN Micro CT

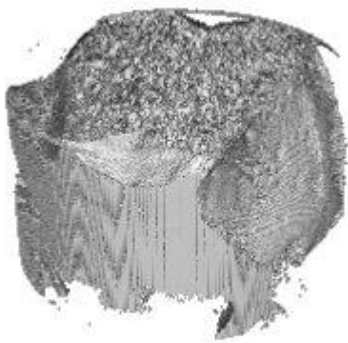


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 751.1268	Std Dev: 950.4230
Volumen (mm^3): 2175.5146	Volumen de Hueso (mm^3): 677.0730
Voxels: 58714230	BMC (mg) 491.6926
BMD (mg/cc): 256.2474	TMC (mg): 395.9039
TMD (mg/cc): 584.7285	BVF: 0.3112

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 11.79	Tb.Sp. 3D (pixels): 29.54
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0.393195	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0.9016

Control de 24h (12C)

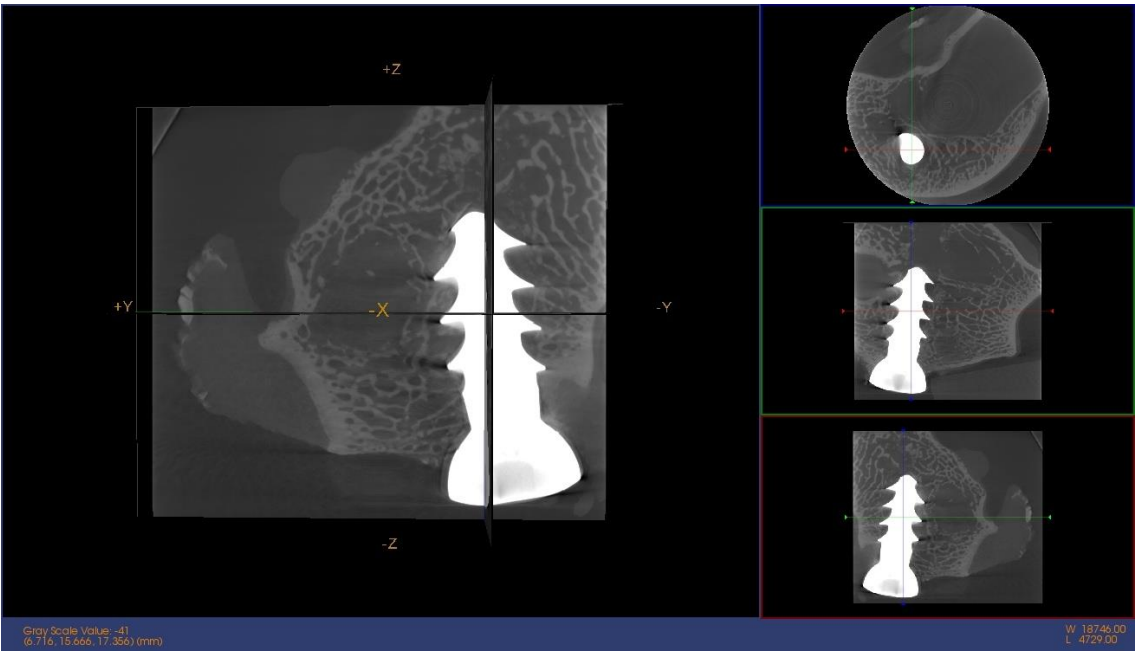


IMAGEN Micro CT

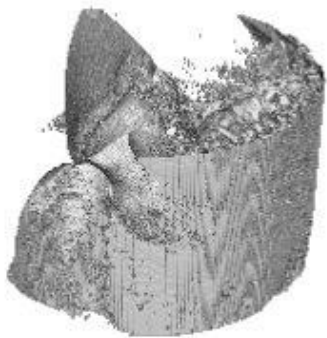


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 217.1800	Std Dev: 838.2974
Volumen (mm^3): 2321.5321	Volumen de Hueso (mm^3): 563.8856
Voxels: 62655049	BMC (mg) 304.4435
BMD (mg/cc): 536.8503	TMC (mg): 499.7598
TMD (mg/cc): 886.2787	BVF: 0.2429

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 9.95	Tb.Sp. 3D (pixels): 86.15
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0.331617	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0.7128

Control 48h (15C)

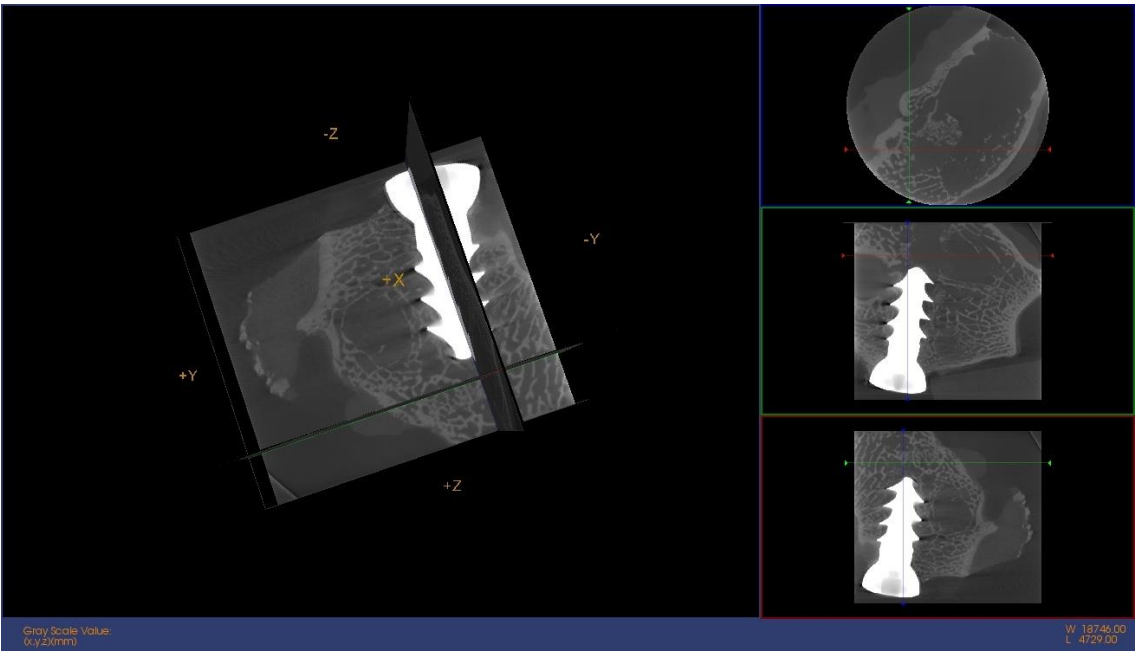


IMAGEN Micro CT

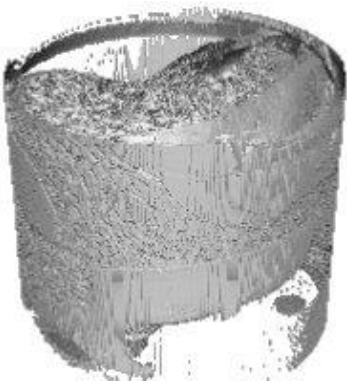


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 404.9759	Std Dev: 1240.7656
Volumen (mm^3): 5180.2246	Volumen de Hueso (mm^3): 1215.0847
Voxels: 111122768	BMC (mg) 547.2916
BMD (mg/cc): 330.6986	TMC (mg): 724.4812
TMD (mg/cc): 596.2393	BVF: 0.2346

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 13.43	Tb.Sp. 3D (pixels): 115.01
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0.483475	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0.5861

Control 5 días (2C)

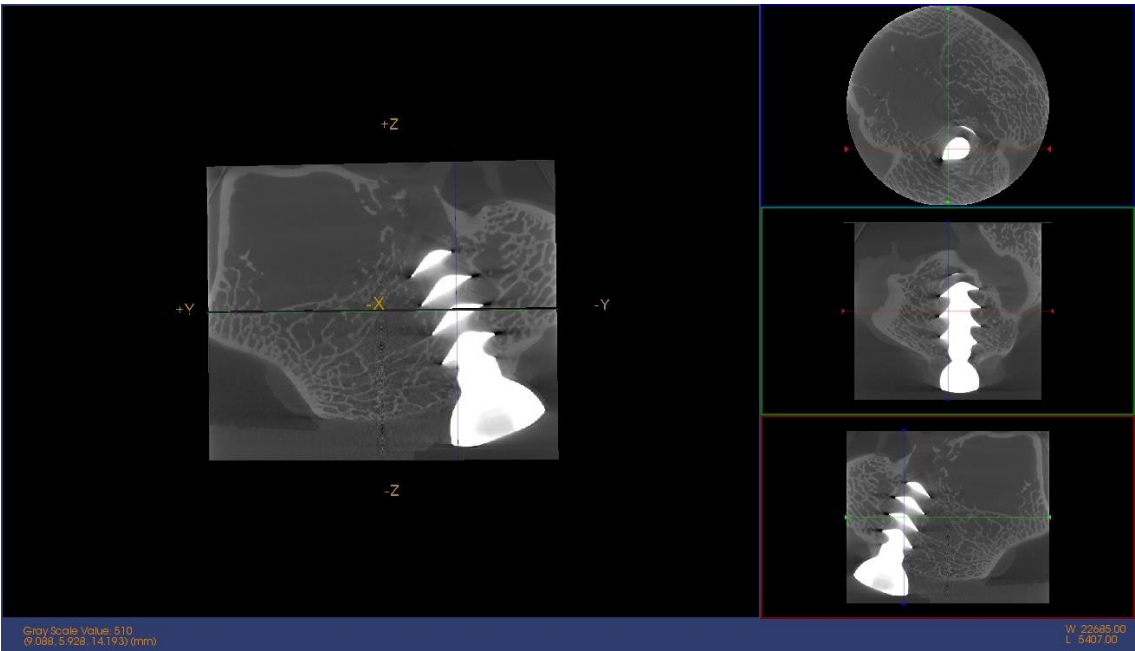


IMAGEN Micro CT

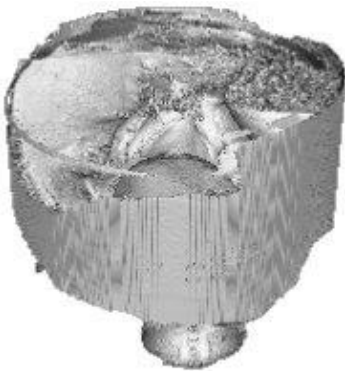


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 487.8071	Std Dev: 1591.2756
Volumen (mm^3): 5192.3556	Volumen de Hueso (mm^3): 1196.3064
Voxels: 111382995	BMC (mg) 583.7129
BMD (mg/cc): 264.1584	TMC (mg): 769.8083
TMD (mg/cc): 643.4875	BVF: 0.2304

MedidasDirectas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 10.88	Tb.Sp. 3D (pixels): 92.55
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0.391524	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0.667

OHAp 24h (1)

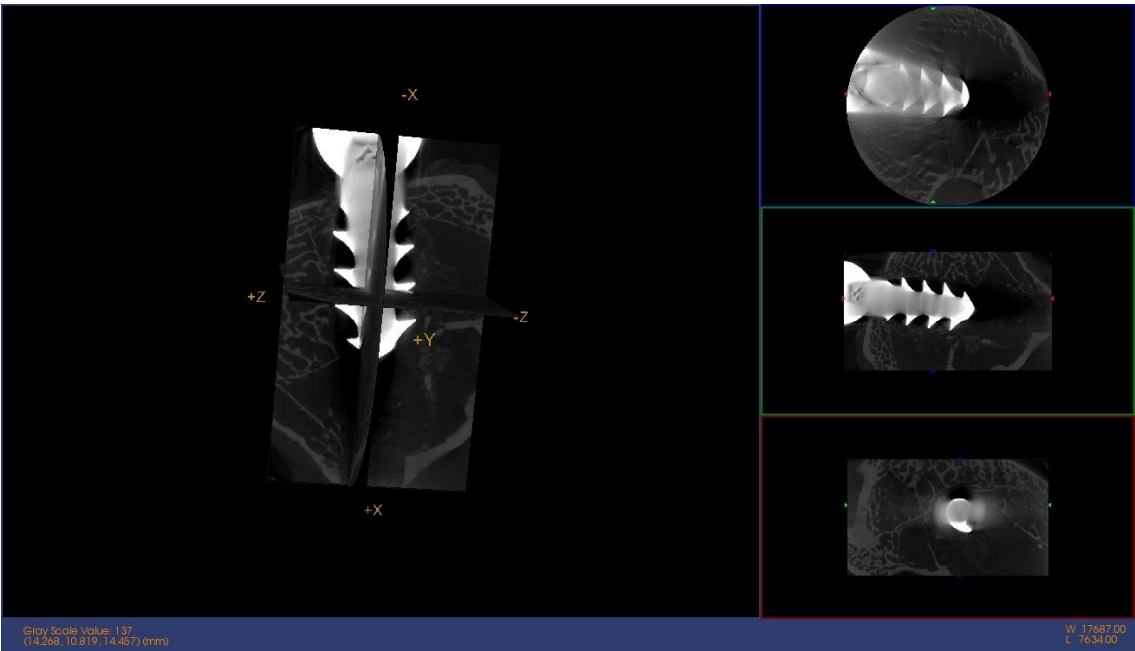


IMAGEN Micro CT

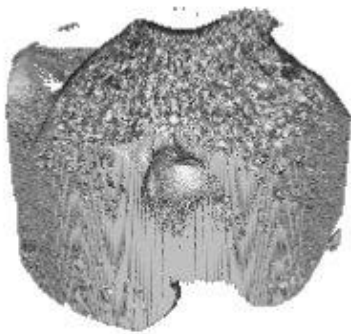


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 1028.8419	Std Dev: 1164.1370
Volumen (mm^3): 2252.9385	Volumen de Hueso (mm^3): 703.2866
Voxels: 60803799	BMC (mg) 630.9299
BMD (mg/cc): 403.4237	TMC (mg): 464.0809
TMD (mg/cc): 659.8746	BVF: 0.3122

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 12.31	Tb.Sp. 3D (pixels): 47.39
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0.410554	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0.8421

OHAp 24h (6)

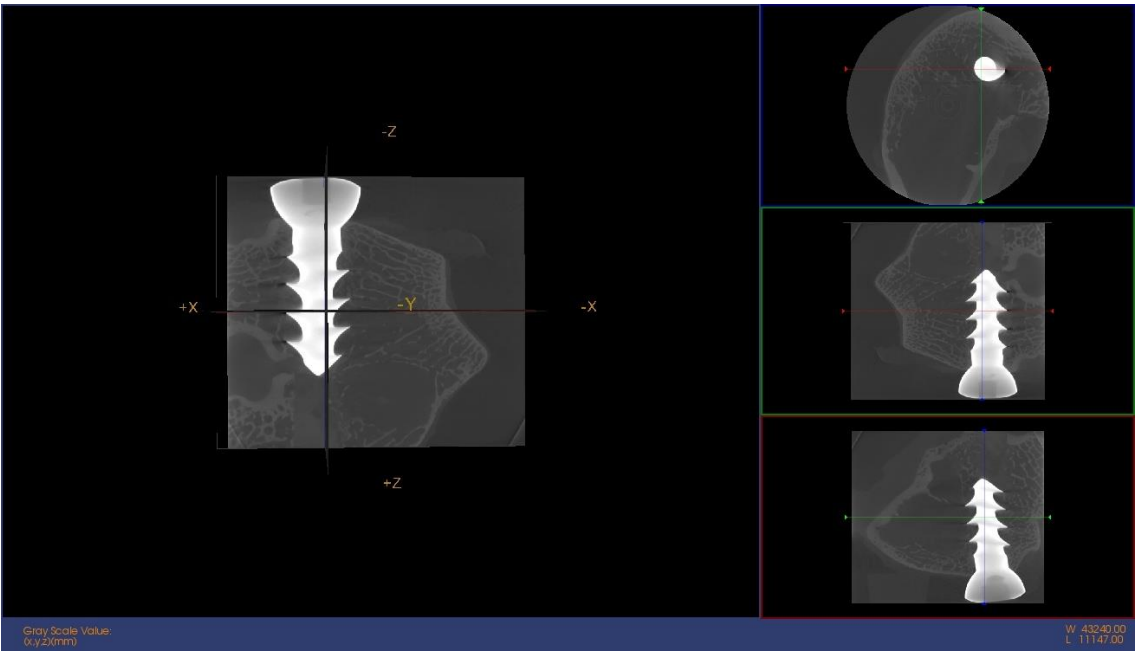


IMAGEN Micro CT

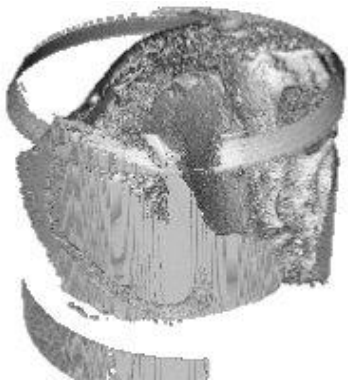


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 63.7282	Std Dev: 1488.2228
Volumen (mm^3): 5170.0552	Volumen de Hueso (mm^3): 1075.6855
Voxels: 110904620	BMC (mg) 66.5907
BMD (mg/cc): 193.3838	TMC (mg): 531.7729
TMD (mg/cc): 494.3572	BVF: 0.2081

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 13.07	Tb.Sp. 3D (pixels): 115.79
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0.470292	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0.5833

OHAp 48h (10)

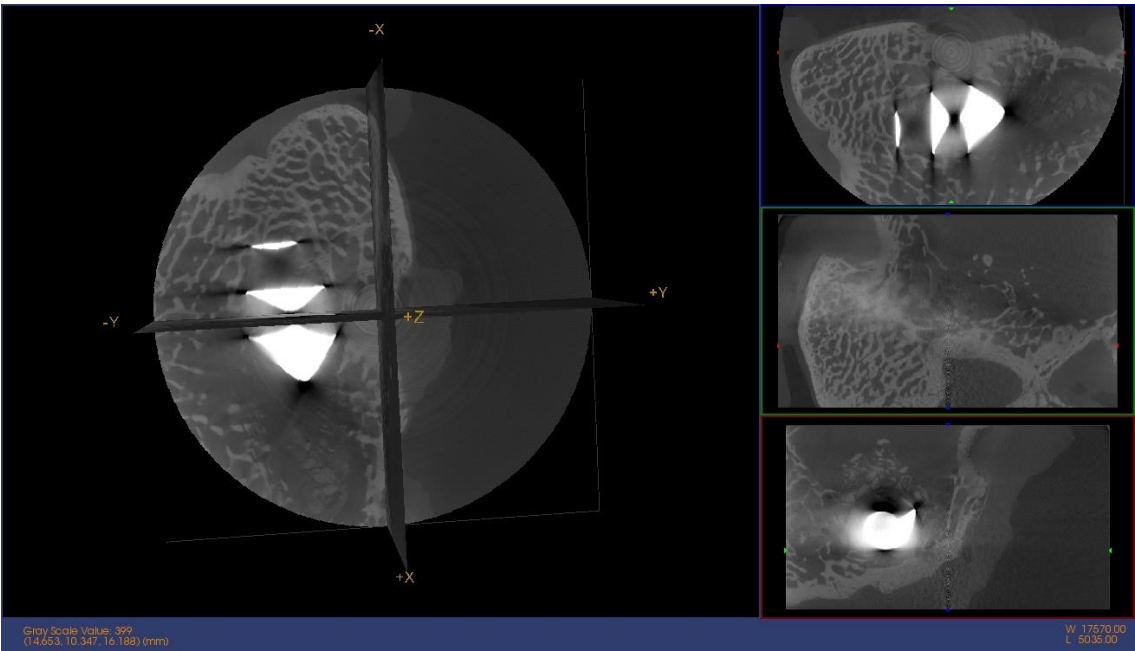
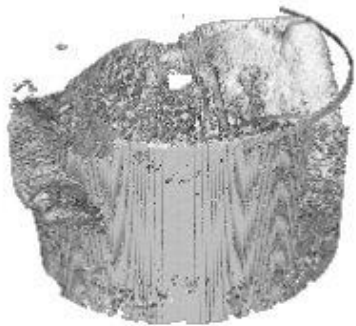


IMAGEN Micro CT



M
IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 1376.3614	Std Dev: 1249.9910
Volumen (mm^3): 1428.5582	Volumen de Hueso (mm^3): 457.8823
Voxels: 38554876	BMC (mg) 520.6678
BMD (mg/cc): 382.3343	TMC (mg): 356.7053
TMD (mg/cc): 779.0326	BVF: 0.3205

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 12.54	Tb.Sp. 3D (pixels): 21.55
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0.418035	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0.9282

OHAp 48h (14)

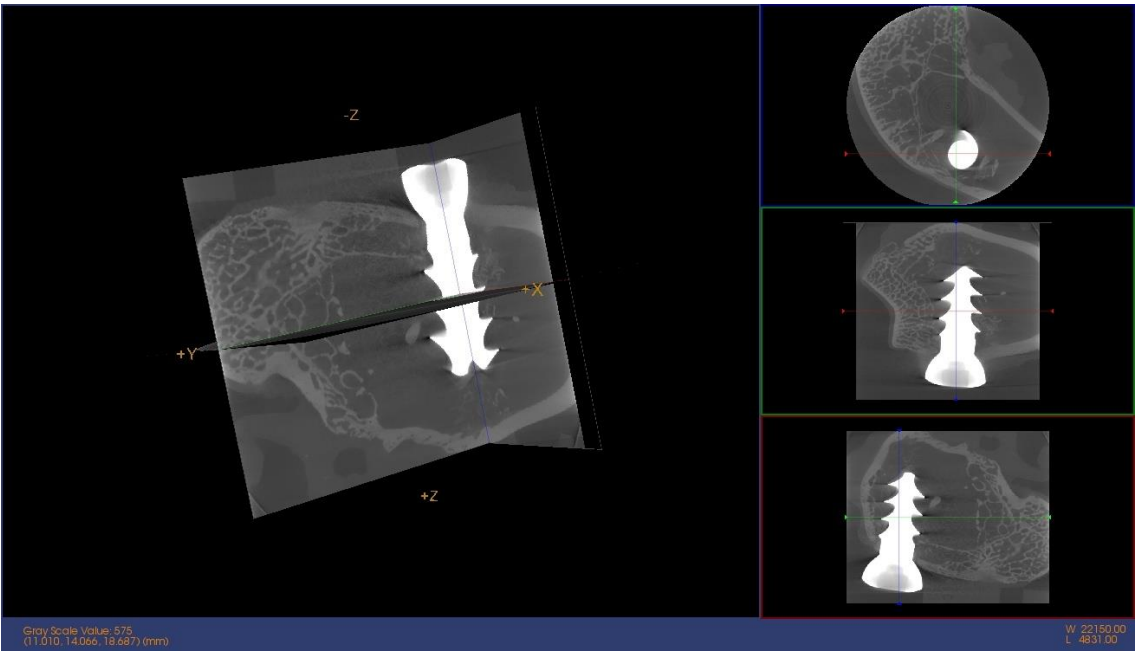


IMAGEN Micro CT

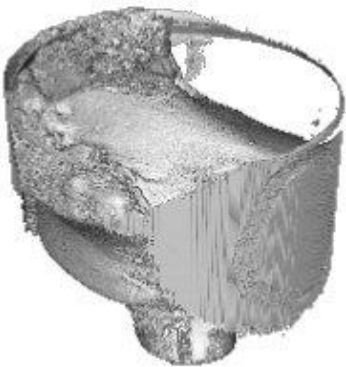


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 541.7694	Std Dev: 1308.4149
Volumen (mm^3): 5165.6935	Volumen de Hueso (mm^3): 1234.9740
Voxels: 110811056	BMC (mg) 639.4619
BMD (mg/cc): 234.1772	TMC (mg): 697.8178
TMD (mg/cc): 565.0465	BVF: 0.2391

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 14.26	Tb.Sp. 3D (pixels): 87.50
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0.513300	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0.6851

OHAp 5 días (16)

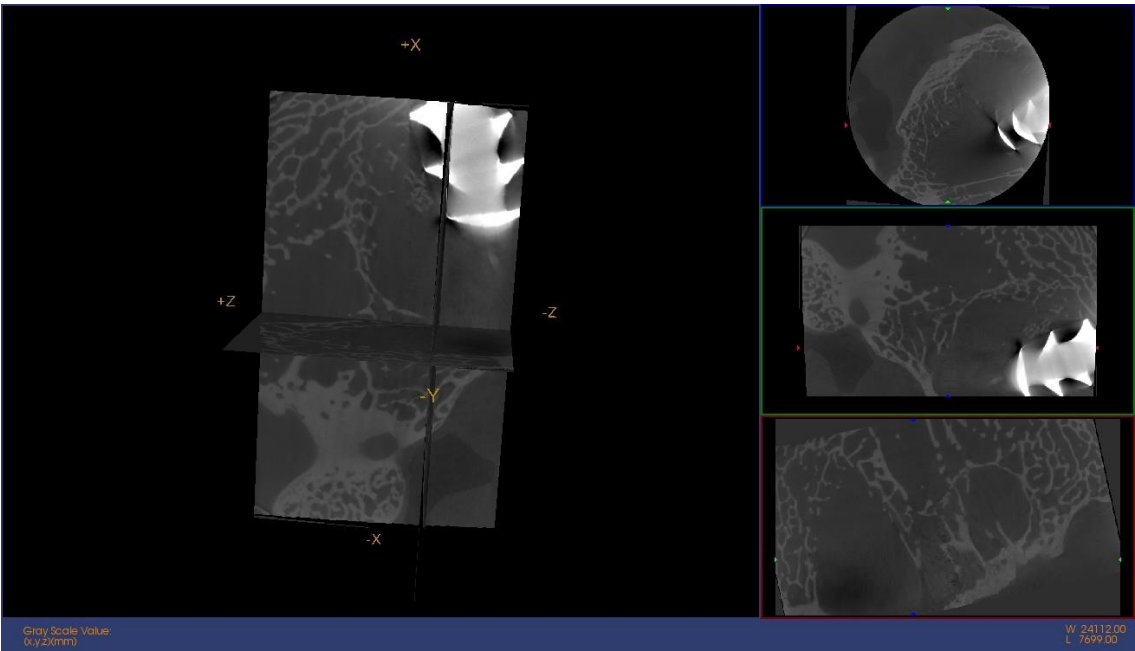


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 1151.0853	Std Dev: 1243.9858
Volumen (mm^3): 2303.0785	Volumen de Hueso (mm^3): 684.1642
Voxels: 62157010	BMC (mg) 484.2638
BMD (mg/cc): 212.246	TMC (mg): 344.7990
TMD (mg/cc): 503.9710	BVF: 0.2971

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 10.22	Tb.Sp. 3D (pixels): 59.43
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0.340548	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0.8019

OHAp 5 días (21)

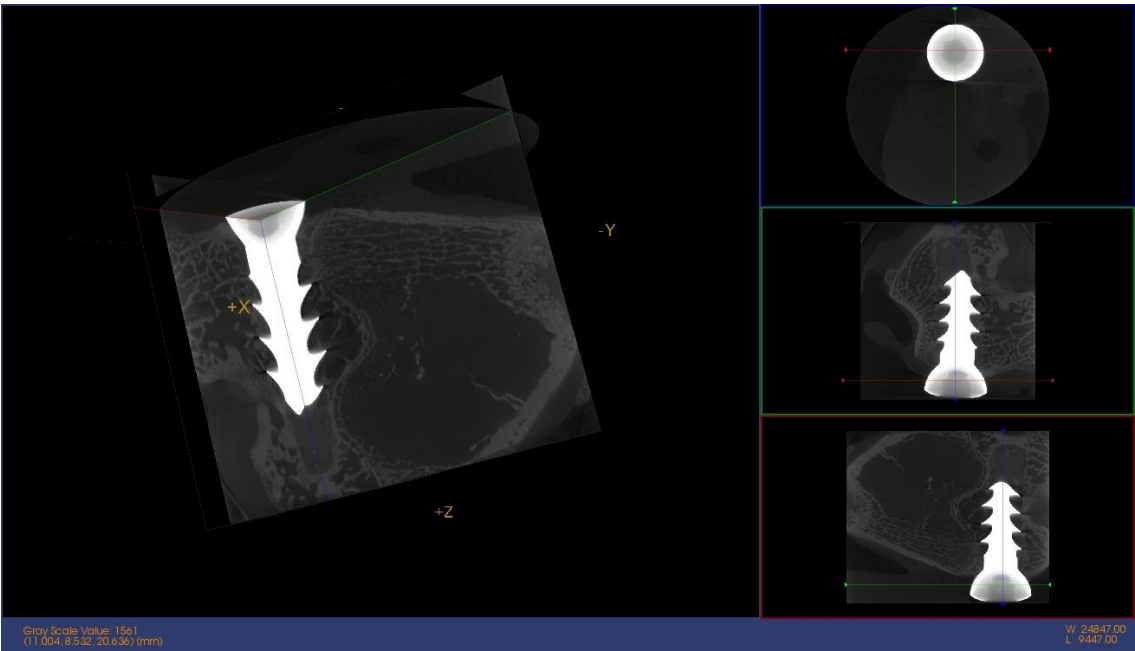


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 319.5248	Std Dev: 1326.6246
Volumen (mm^3): 5184.1009	Volumen de Hueso (mm^3): 1320.7015
Voxels: 111205919	BMC (mg) 385.6302
BMD (mg/cc): 316.8156	TMC (mg): 676.9727
TMD (mg/cc): 512.5857	BVF: 0.2548

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 16.57	Tb.Sp. 3D (pixels): 122.56
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0.596372	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0.559

OHAp-Fn 24h (24)

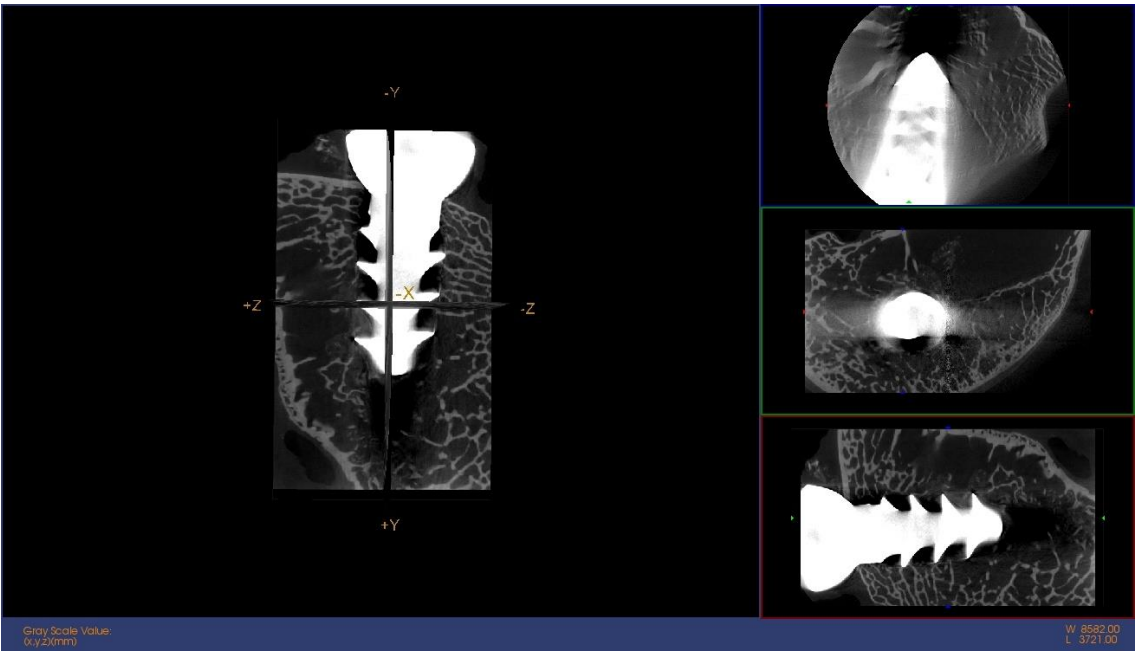


IMAGEN Micro CT

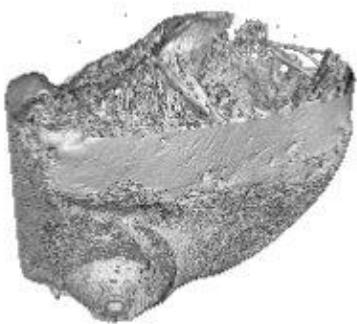


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 829.5269	Std Dev: 1265.7774
Volumen (mm^3): 2215.3718	Volumen de Hueso (mm^3): 631.6750
Voxels: 59789924	BMC (mg) 526.8136
BMD (mg/cc): 548.0128	TMC (mg): 445.7867
TMD (mg/cc): 705.7216	BVF: 0.2851

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 16.32	Tb.Sp. 3D (pixels): 58.30
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0.544116	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0.8057

OHAp-Fn (26)

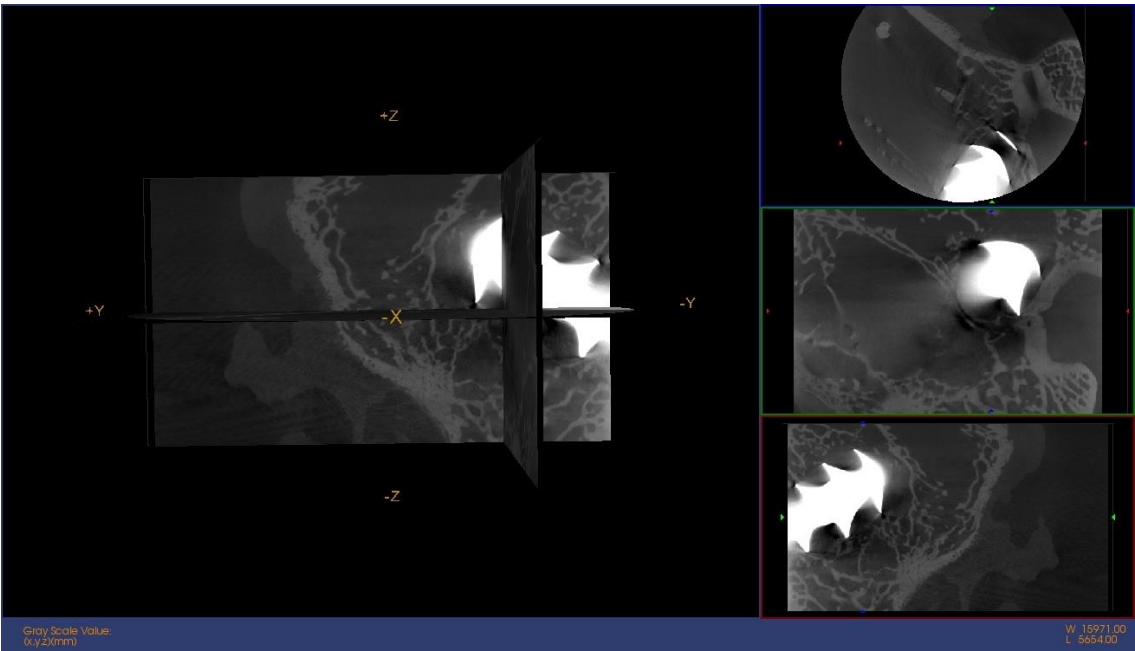


IMAGEN Micro CT

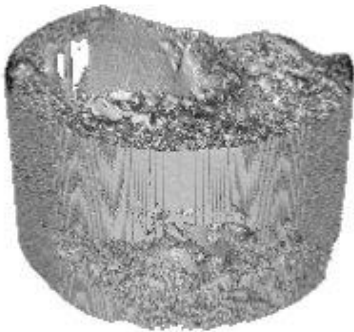


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 710.7889	Std Dev: 1195.1073
Volumen (mm^3): 2308.9492	Volumen de Hueso (mm^3): 625.9935
Voxels: 62315452	BMC (mg) 457.1603
BMD (mg/cc): 376.7034	TMC (mg): 409.5909
TMD (mg/cc): 654.3053	BVF: 0.2711

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 16.07	Tb.Sp. 3D (pixels): 115.52
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0.535612	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0.6149

OHAp-Fn 24h (27)

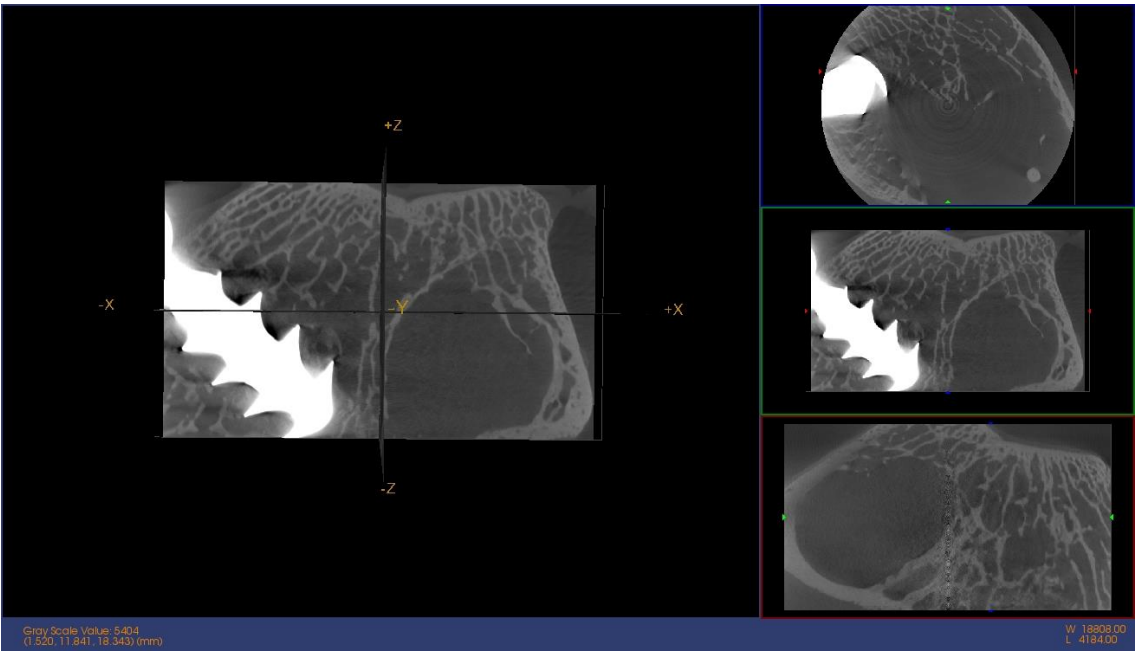


IMAGEN Micro CT

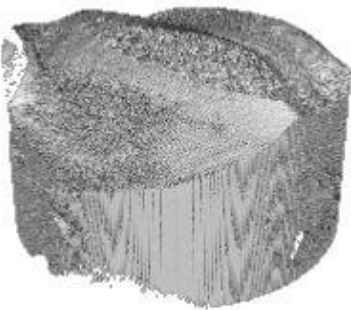


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 311.9953	Std Dev: 1356.3949
Volumen (mm^3): 2277.7583	Volumen de Hueso (mm^3): 708.0098
Voxels: 61473652	BMC (mg) 184.4973
BMD (mg/cc): 224.2024	TMC (mg): 368.2053
TMD (mg/cc): 520.0568	BVF: 0.3108

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 11.99	Tb.Sp. 3D (pixels): 73.38
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0.399693	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0.7534

OHAp-Fn 48h (30)

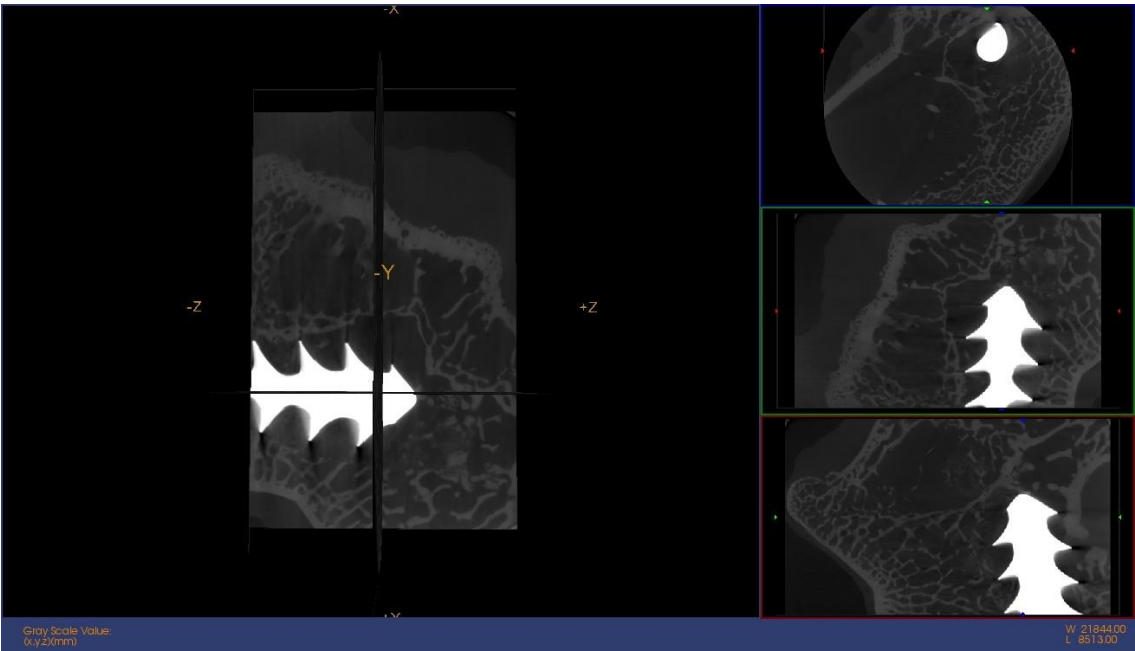


IMAGEN Micro CT

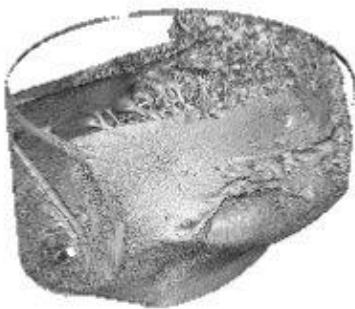


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 739.0329	Std Dev: 1057.7835
Volumen (mm^3): 2299.5923	Volumen de Hueso (mm^3): 567.4251
Voxels: 62062923	BMC (mg) 386.0152
BMD (mg/cc): 298.7767	TMC (mg): 299.9683
TMD (mg/cc): 528.6482	BVF: 0.2468

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 9.46	Tb.Sp. 3D (pixels): 62.73
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0.315498	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0.7909

OHAp-Fn 48h (31)

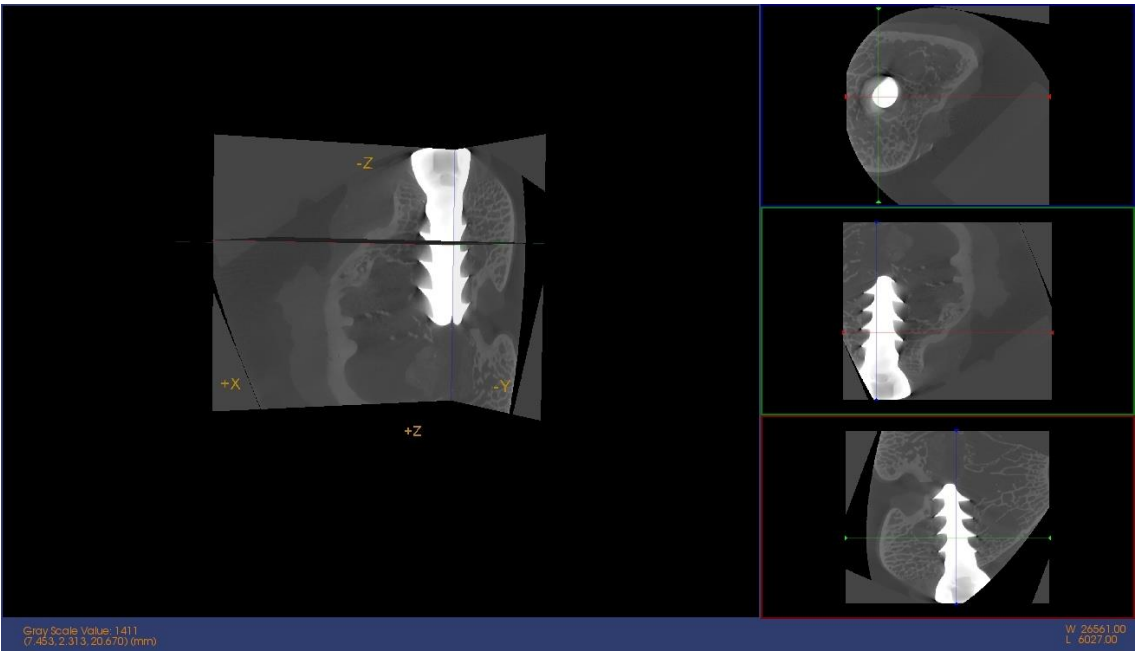


IMAGEN Micro CT

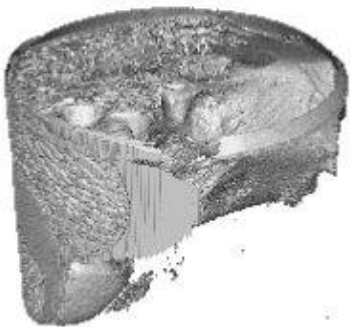


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 434.0376	Std Dev: 1315.9966
Volumen (mm^3): 5187.7723	Volumen de Hueso (mm^3): 1058.7903
Voxels: 111284676	BMC (mg) 594.2110
BMD (mg/cc): 312.9163	TMC (mg): 726.9213
TMD (mg/cc): 686.5583	BVF: 0.2041

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 14.56	Tb.Sp. 3D (pixels): 137.61
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0.523852	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0.505

OHAp-Fn 48h (32)

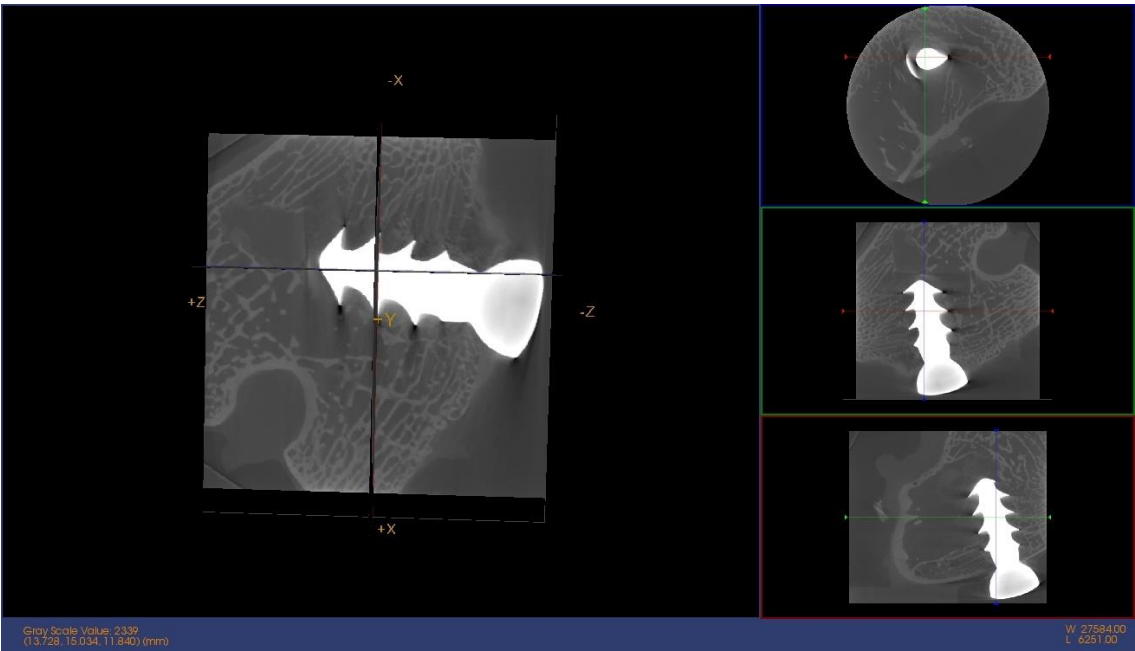


IMAGEN Micro CT

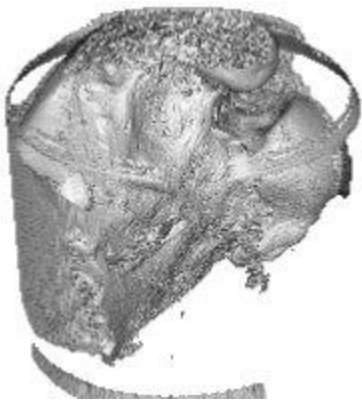


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 364.2248	Std Dev: 1362.8767
Volumen (mm^3): 5196.5186	Volumen de Hueso (mm^3): 1164.6462
Voxels: 111472295	BMC (mg) 490.4293
BMD (mg/cc): 344.3739	TMC (mg): 728.4428
TMD (mg/cc): 625.4628	BVF: 0.2241

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 13.91	Tb.Sp. 3D (pixels): 111.73
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0.500556	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0.5979

OHAp-Fn 5 días (36)

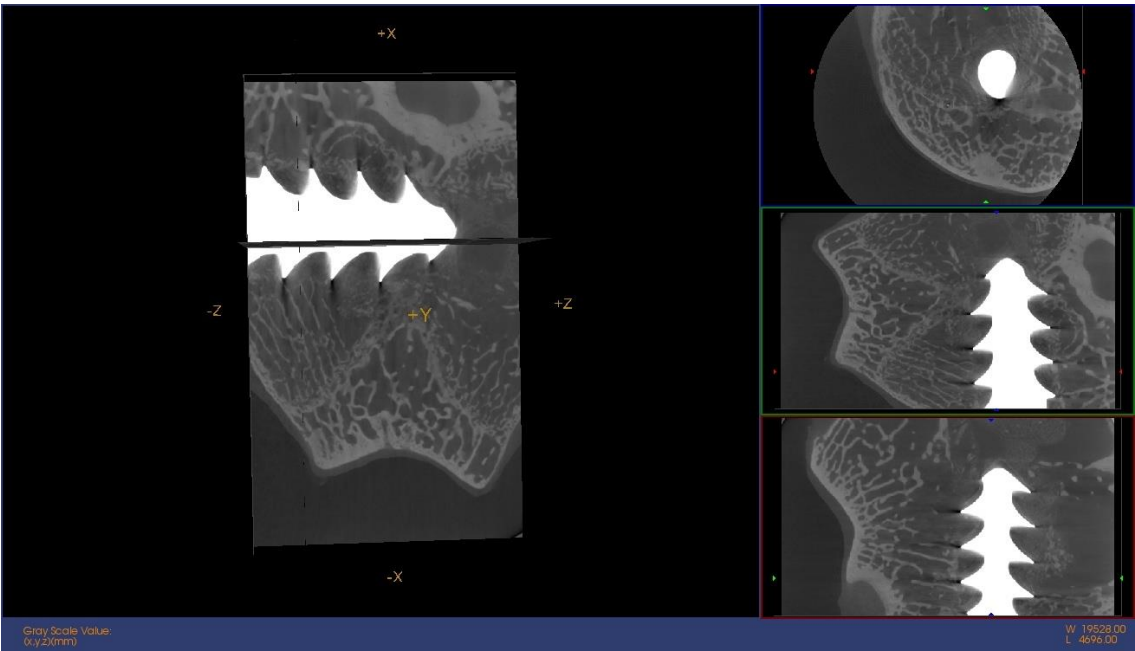


IMAGEN Micro CT

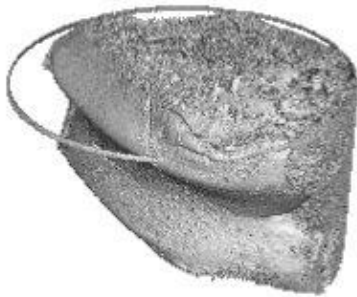


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 111.9510	Std Dev: 1677.4087
Volumen (mm^3): 2315.9641	Volumen de Hueso (mm^3): 811.1740
Voxels: 62504776	BMC (mg) 57.4915
BMD (mg/cc): 213.4365	TMC (mg): 355.6808
TMD (mg/cc): 438.4766	BVF: 0.3503

Direct Measures Results	
Tb.Th. 3D (pixels): 11.00	Tb.Sp. 3D (pixels): 40.54
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0.366761	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0.865

OHAp-Fn 5 días (40)

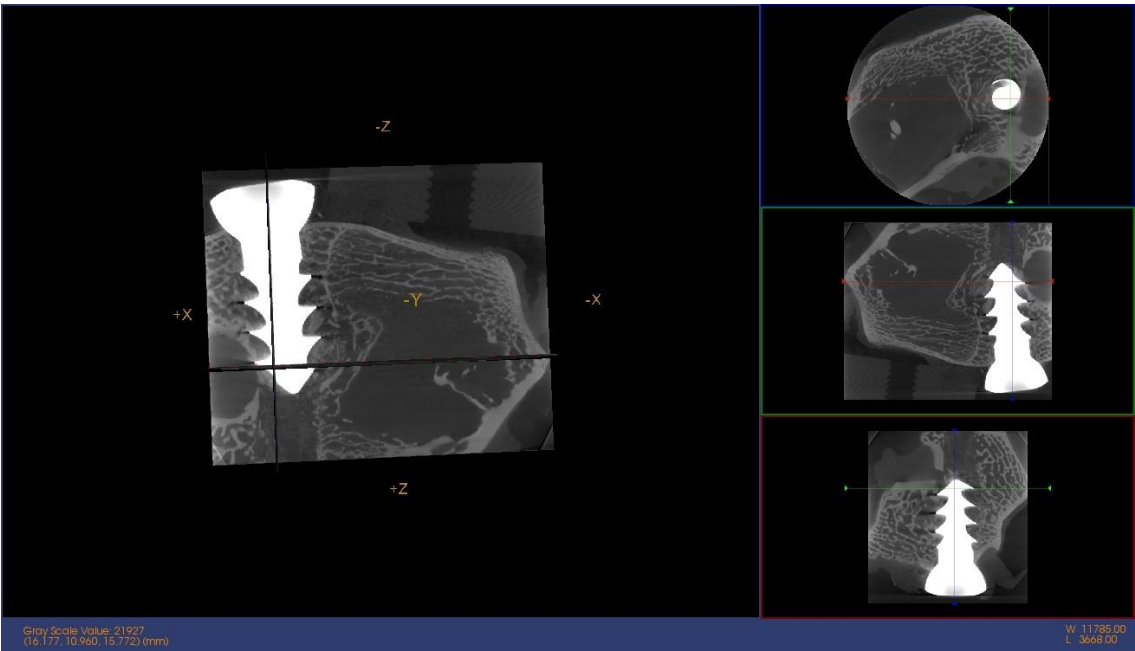


IMAGEN Micro CT

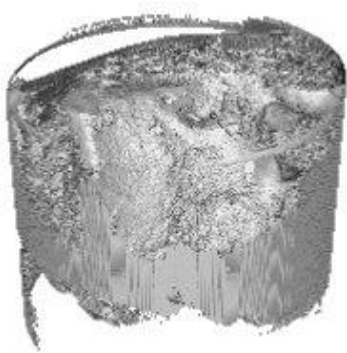


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 456.7890	Std Dev: 1201.4088
Volumen (mm^3): 5188.5956	Volumen de Hueso (mm^3): 1302.5514
Voxels: 111302338	BMC (mg) 645.4595
BMD (mg/cc): 360.717	TMC (mg): 775.9733
TMD (mg/cc): 595.7333	BVF: 0.2510

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 15.15	Tb.Sp. 3D (pixels): 110.94
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0.545338	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0.6008

OHAp-Fn 5 días (41)

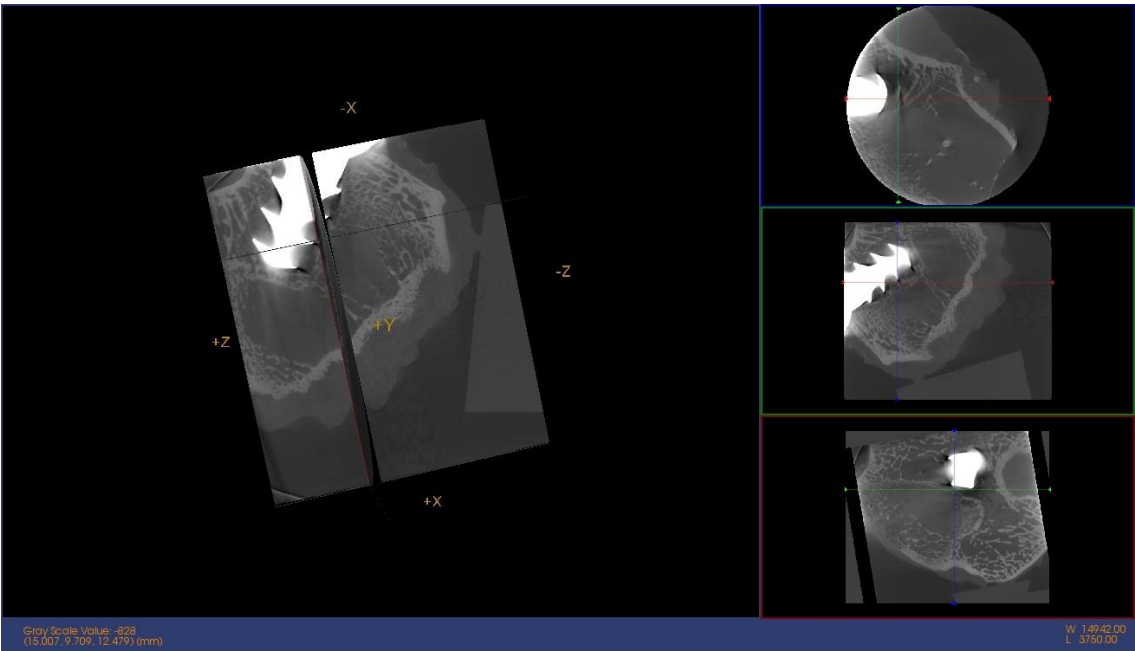


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 327.0067	Std Dev: 1401.9815
Volumen (mm^3): 5217.0759	Volumen de Hueso (mm^3): 1051.5195
Voxels: 111913277	BMC (mg) 452.7723
BMD (mg/cc): 356.1477	TMC (mg): 724.3328
TMD (mg/cc): 688.8439	BVF: 0.2016

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 18.82	Tb.Sp. 3D (pixels): 146.02
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0.677458	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0.4745

Análisis detallado de las muestras

Zona próxima al tornillo (derecha).

Control 24h (10)

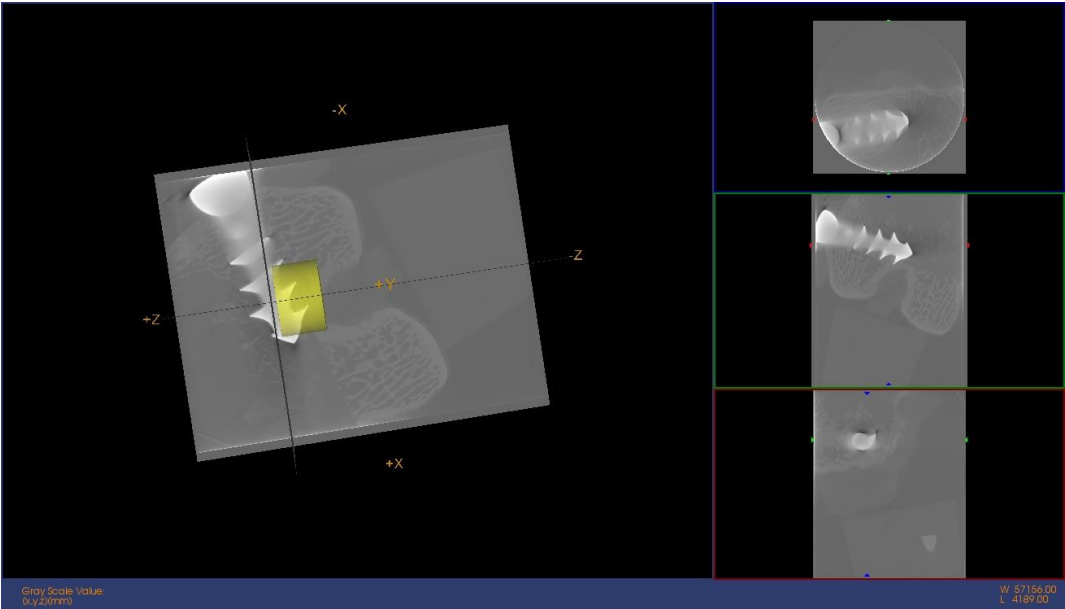


IMAGEN Micro CT

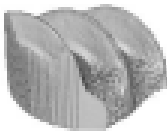


IMAGEN 3D

BMD Resultados			
Media:	5135,8571	Std Dev:	7703,73
Volumen (mm^3):	58,0911	Volumen de Hueso (mm^3):	17,9359
Voxels:	1567800	BMC (mg)	10,89
BMD (mg/cc):	187,4646	TMC (mg):	2,6604
TMD (mg/cc):	148,3303	BVF:	0,3088

Medidas Directas Resultados			
Tb.Th. 3D (pixels):	56,21	Tb.Sp. 3D (pixels):	56,49
Calib. Tb.Th. 3D (mm):	1,873859	Calib. Tb.Sp. 3D (mm):	0,8167

Control 24h (11C)

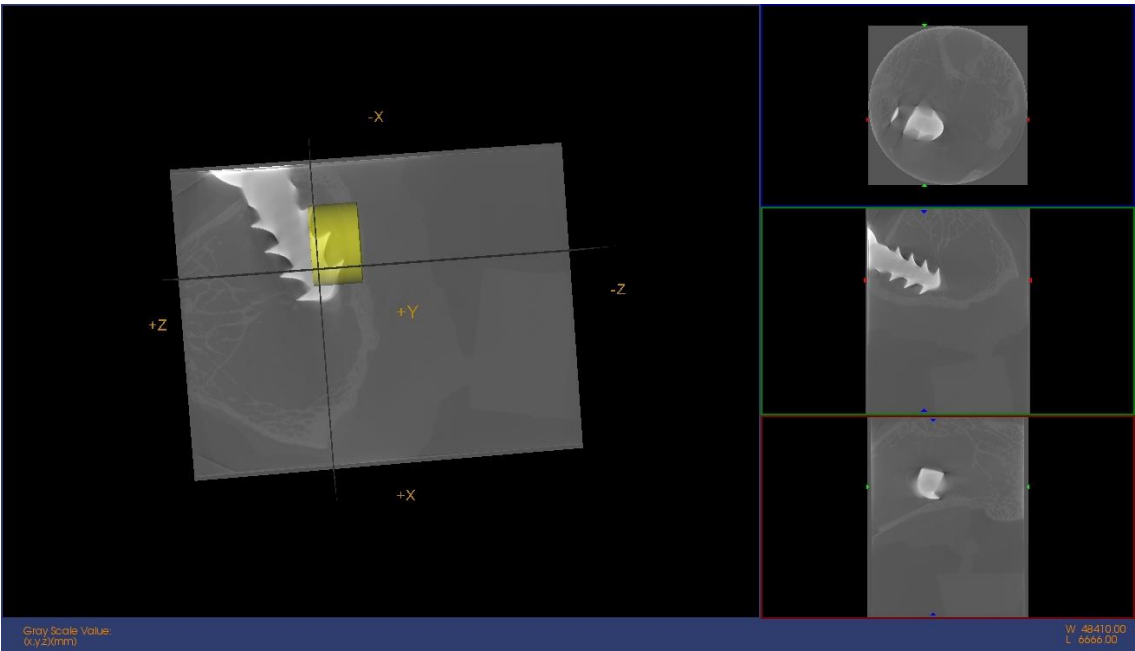


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados			
Media:	4307,1555	Std Dev:	5904,51
Volumen (mm^3):	58,0911	Volumen de Hueso (mm^3):	13,2496
Voxels:	1567800	BMC (mg)	24,0754
BMD (mg/cc):	414,4417	TMC (mg):	4,818
TMD (mg/cc):	363,6312	BVF:	0,2281

Medidas Directas Resultados			
Tb.Th. 3D (pixels):	49,13	Tb.Sp. 3D (pixels):	66,29
Calib. Tb.Th. 3D (mm):	1,638043	Calib. Tb.Sp. 3D (mm):	0,779

Control 24h (12)

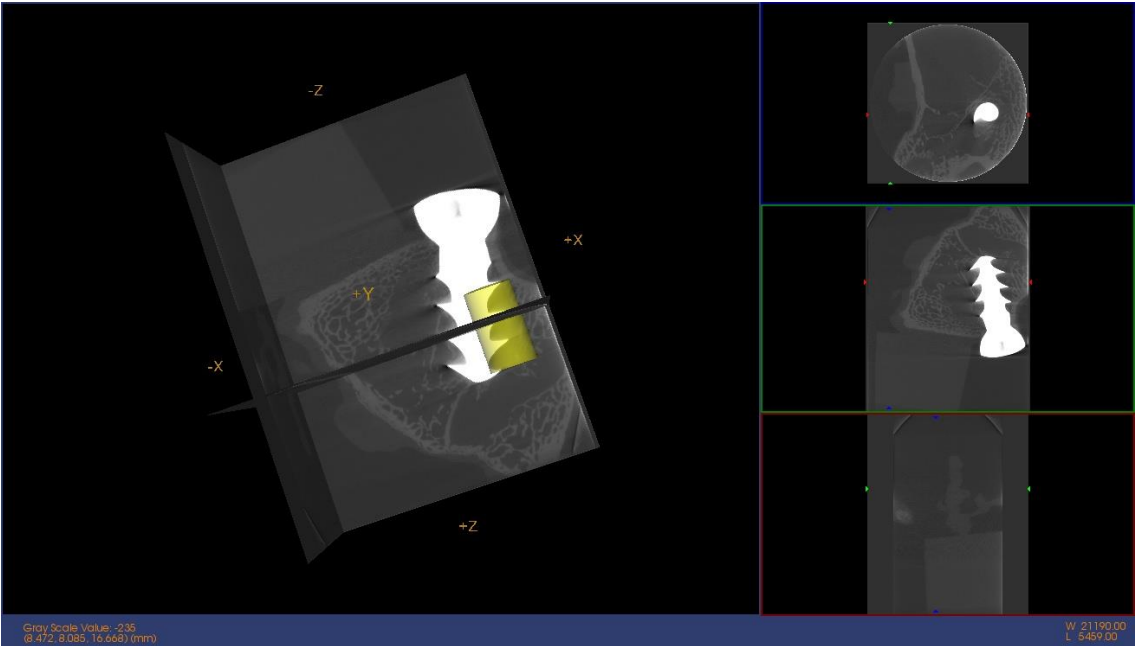


IMAGEN Micro CT

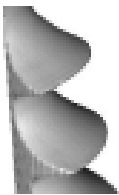


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 7619,6368	Std Dev: 11105,5
Volumen (mm^3): 33,7753	Volumen de Hueso (mm^3): 8,2675
Voxels: 911550	BMC (mg) 20,4087
BMD (mg/cc): 604,2491	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,2448
Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 31,43	Tb.Sp. 3D (pixels): 48,28
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,047917	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,83905

Control 48h (15C)

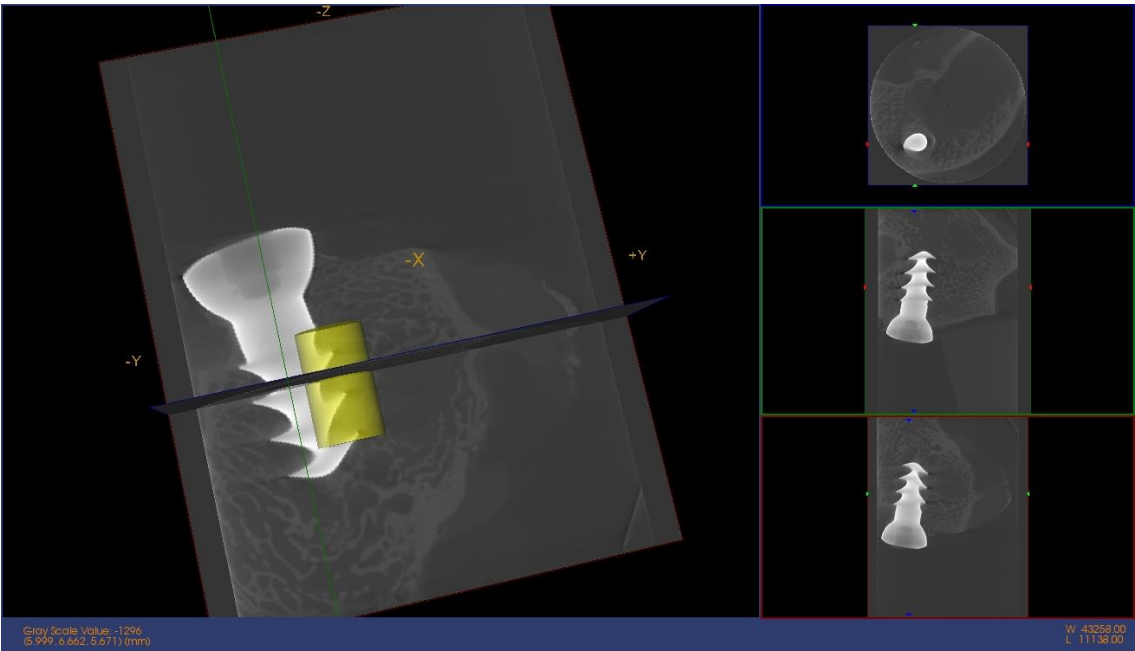


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 7346,9741	Std Dev: 9733,46
Volumen (mm^3): 34,5502	Volumen de Hueso (mm^3): 8,636
Voxels: 741148	BMC (mg) 12,2958
BMD (mg/cc): 355,8816	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,25
Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 24,73	Tb.Sp. 3D (pixels): 42,82
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,890141	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,8459

Control 5 días (2C)

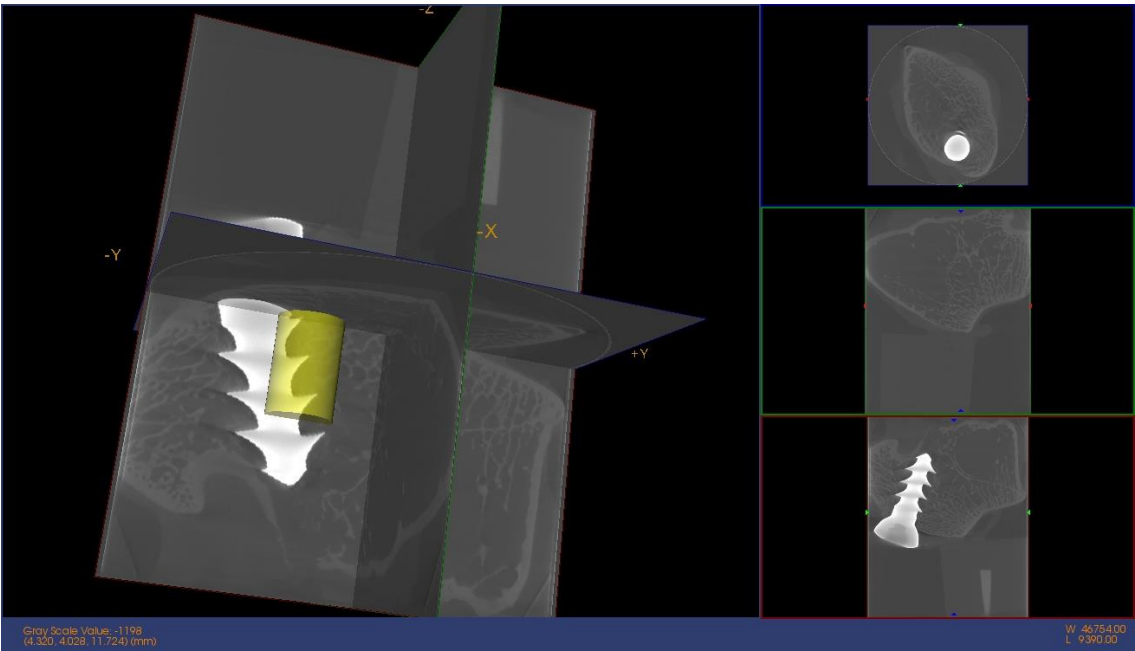


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados		
Media:	8624,9051	Std Dev: 11786,2
Volumen (mm^3):	34,9131	Volumen de Hueso (mm^3): 9,3606
Voxels:	748932	BMC (mg) 8,6072
BMD (mg/cc):	246,5321	TMC (mg):
TMD (mg/cc):		BVF:0,2681

Medidas Directas Resultados		
Tb.Th. 3D (pixels):	30,45	Tb.Sp. 3D (pixels):41,65
Calib. Tb.Th. 3D (mm):	1,096025	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,85011

OHAp 24h (1)

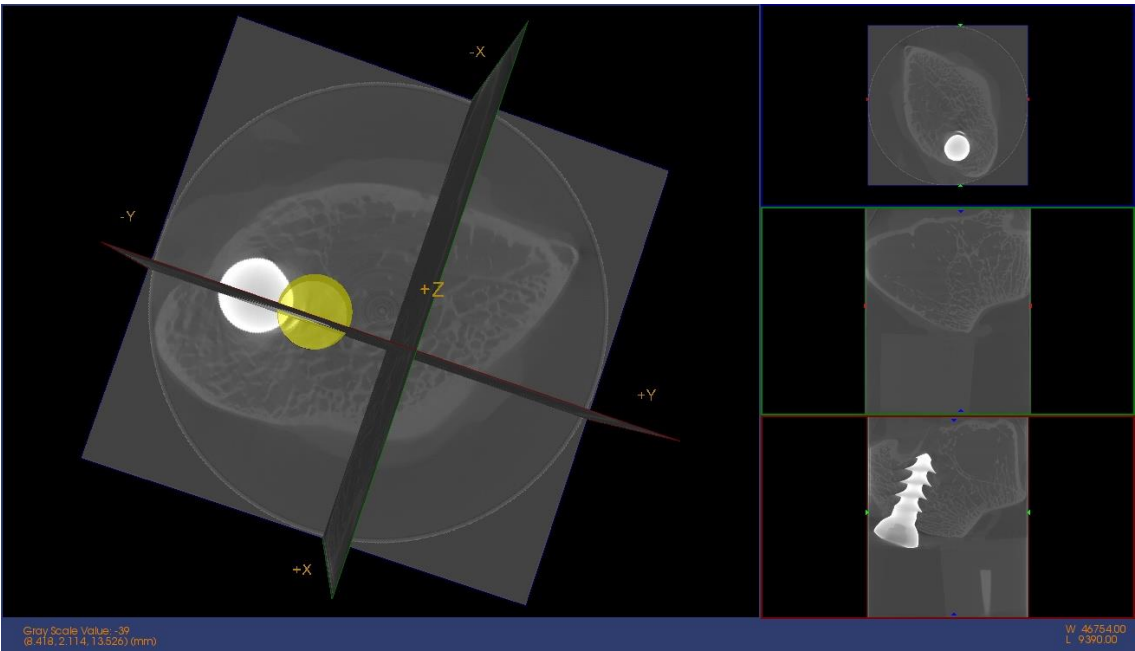


IMAGEN Micro CT

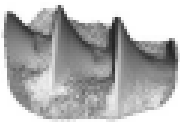


IMAGEN 3D

BMD Resultados			
Media:	3574,4018	Std Dev:	5387,39
Volumen (mm^3):	57,4456	Volumen de Hueso (mm^3):	14,9668
Voxels:	1550380	BMC (mg)	30,6146
BMD (mg/cc):	532,9322	TMC (mg):	17,7736
TMD (mg/cc):	1187,5407	BVF:	0,2605
Medidas Directas Resultados			
Tb.Th. 3D (pixels):	43,44	Tb.Sp. 3D (pixels):	64,8
Calib. Tb.Th. 3D (mm):	1,448233	Calib. Tb.Sp. 3D (mm):	0,78399

OHAp 24h (6)

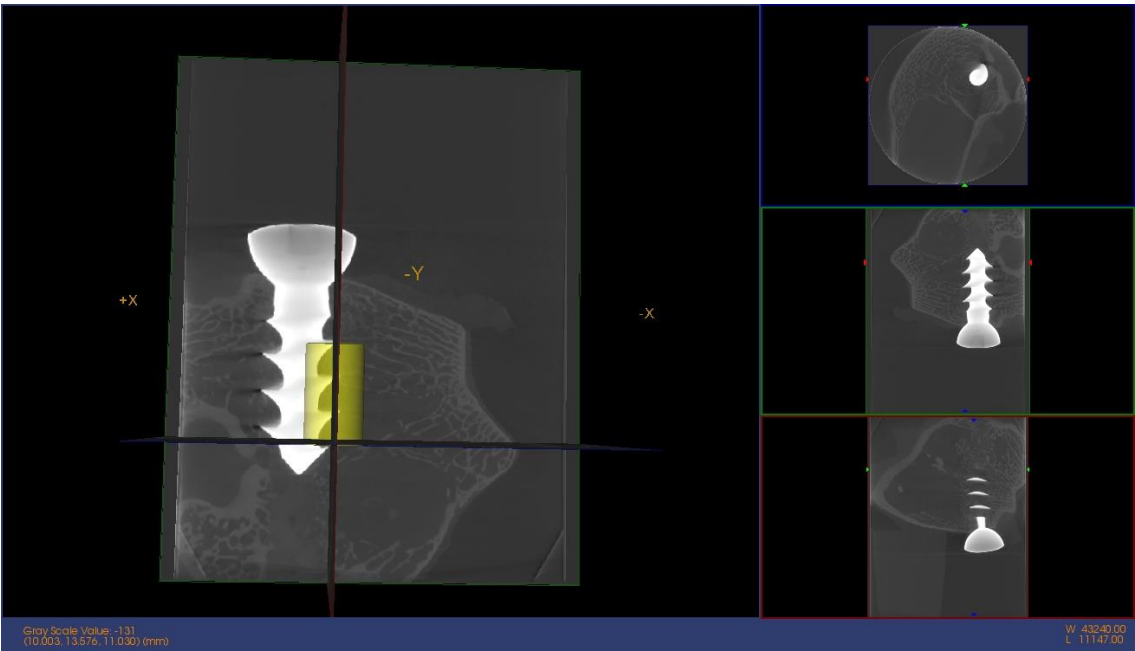


IMAGEN Micro CT

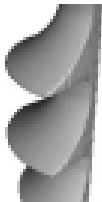


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 7516,509	Std Dev: 12291,6
Volumen (mm^3): 34,5502	Volumen de Hueso (mm^3): 7,7326
Voxels: 741148	BMC (mg) 5,1877
BMD (mg/cc): 150,15	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,2238

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 20,59	Tb.Sp. 3D (pixels): 42,61
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,741153	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,8467

OHAp 48h (10)

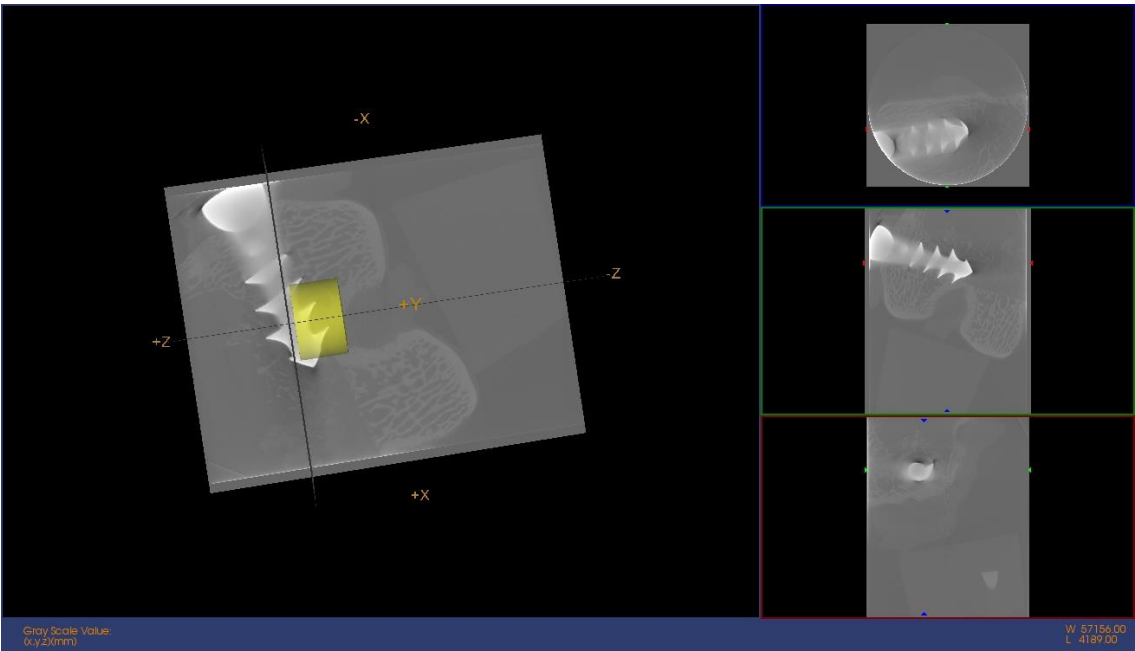


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 5781,5298	Std Dev: 7128,93
Volumen (mm^3): 57,7376	Volumen de Hueso (mm^3): 12,3899
Voxels: 1558260	BMC (mg) 28,6304
BMD (mg/cc): 495,8706	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,2146

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 51,04	Tb.Sp. 3D (pixels): 62,01
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,701595	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,79329

OHAp 48h (14)

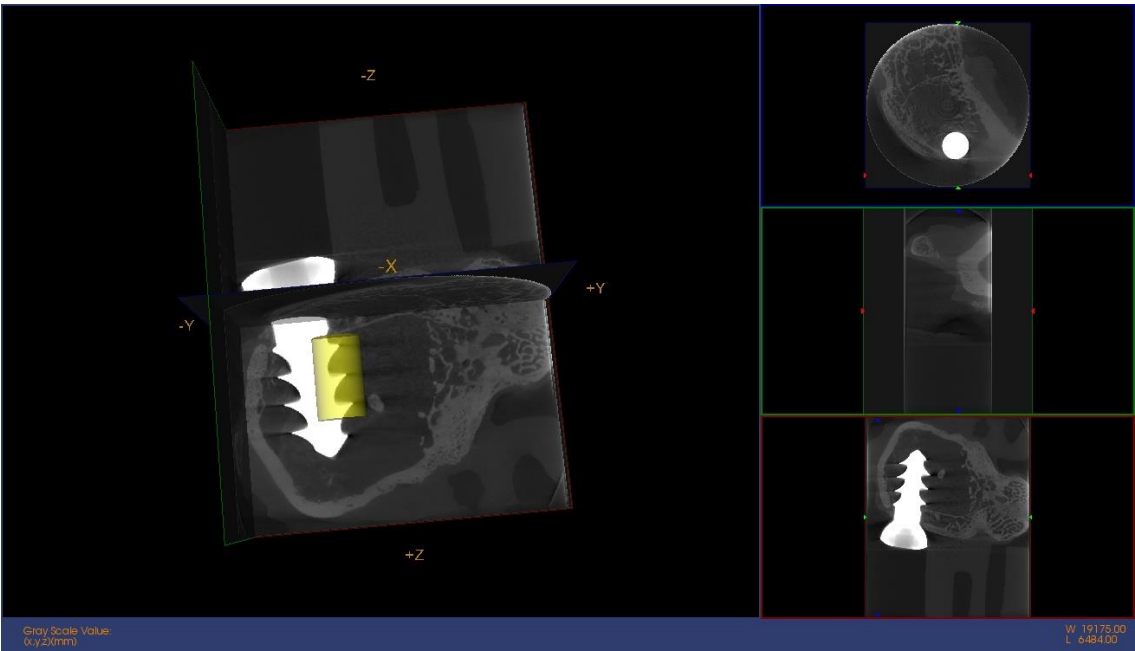


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 9279,7956	Std Dev: 12060,5
Volumen (mm^3): 34,0901	Volumen de Hueso (mm^3): 10,4655
Voxels: 731279	BMC (mg) 7,2528
BMD (mg/cc): 212,7539	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,307

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 28,84	Tb.Sp. 3D (pixels): 37,67
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,037804	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,86442

OHAp 5 días (16)

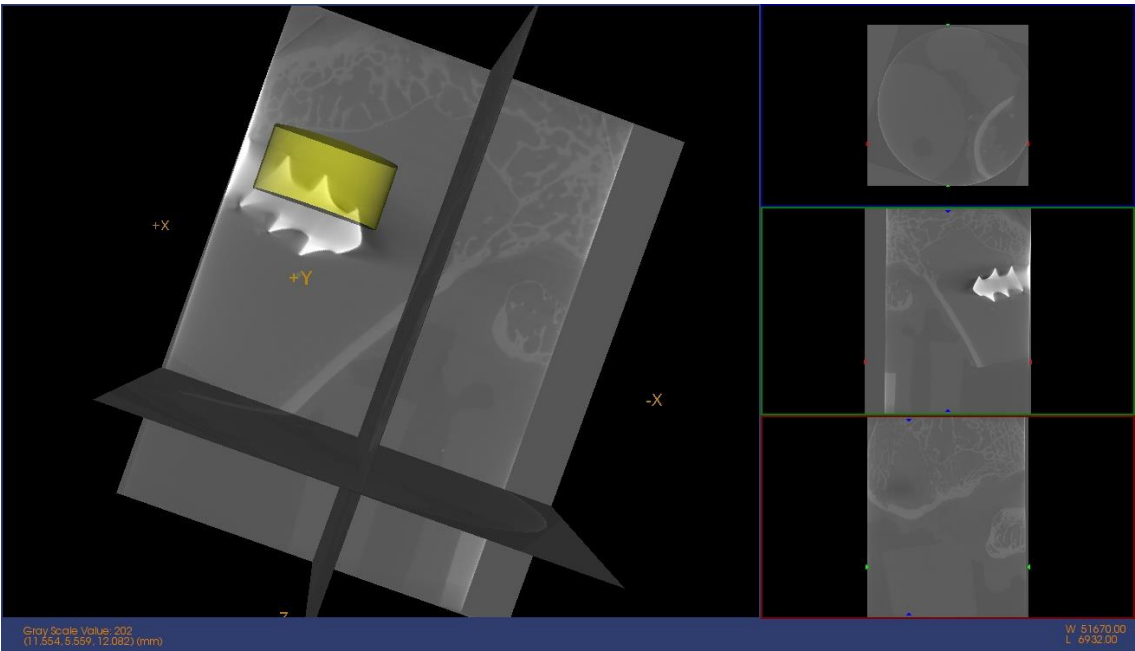


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 4058,1691	Std Dev: 6659,22
Volumen (mm^3): 69,8427	Volumen de Hueso (mm^3): 14,9306
Voxels: 1884960	BMC (mg) 16,0719
BMD (mg/cc): 230,1161	TMC (mg):
TMD (mg/cc): 166,9466	BVF: 0,2138

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 51,51	Tb.Sp. 3D (pixels): 74,47
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,717187	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,75174

OHAp 5 días (21)

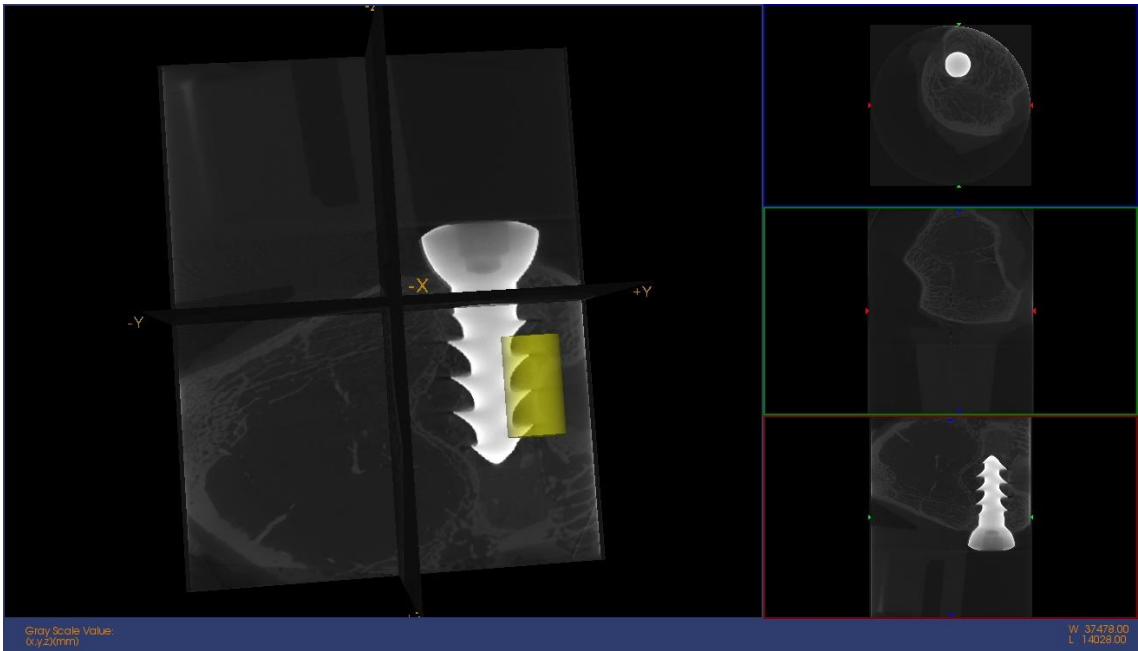


IMAGEN Micro CT

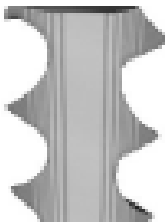


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 5497,8316	Std Dev: 8305
Volumen (mm^3): 34,5502	Volumen de Hueso (mm^3): 4,2196
Voxels: 741148	BMC (mg) 16,4599
BMD (mg/cc): 476,4062	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,1221

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 15,96	Tb.Sp. 3D (pixels): 49,9
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,57439	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,82043

OHAp-Fn 24h (24)

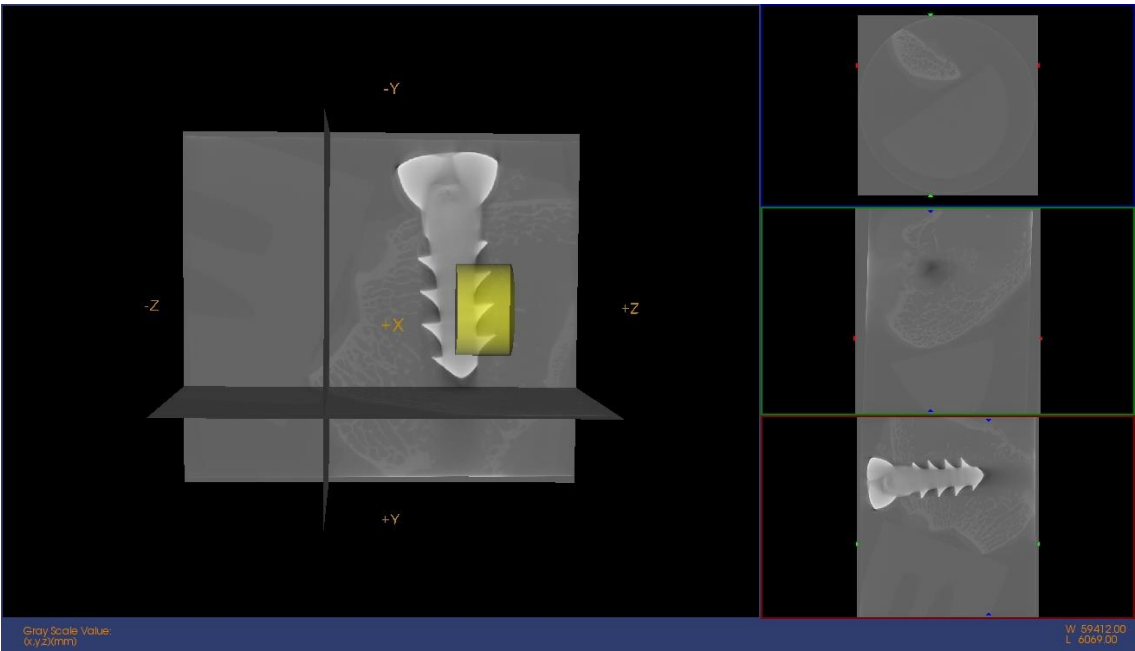


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 4053,8787	Std Dev: 5294,64
Volumen (mm^3):57,7336	Volumen de Hueso (mm^3): 16,916
Voxels: 1558260	BMC (mg) 37,7294
BMD (mg/cc): 653,4637	TMC (mg): 22,0138
TMD (mg/cc): 1301,3591	BVF: 0,293

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 39,11	Tb.Sp. 3D (pixels): 64.95
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,303946	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,78348

OHAp-Fn 24h (26)

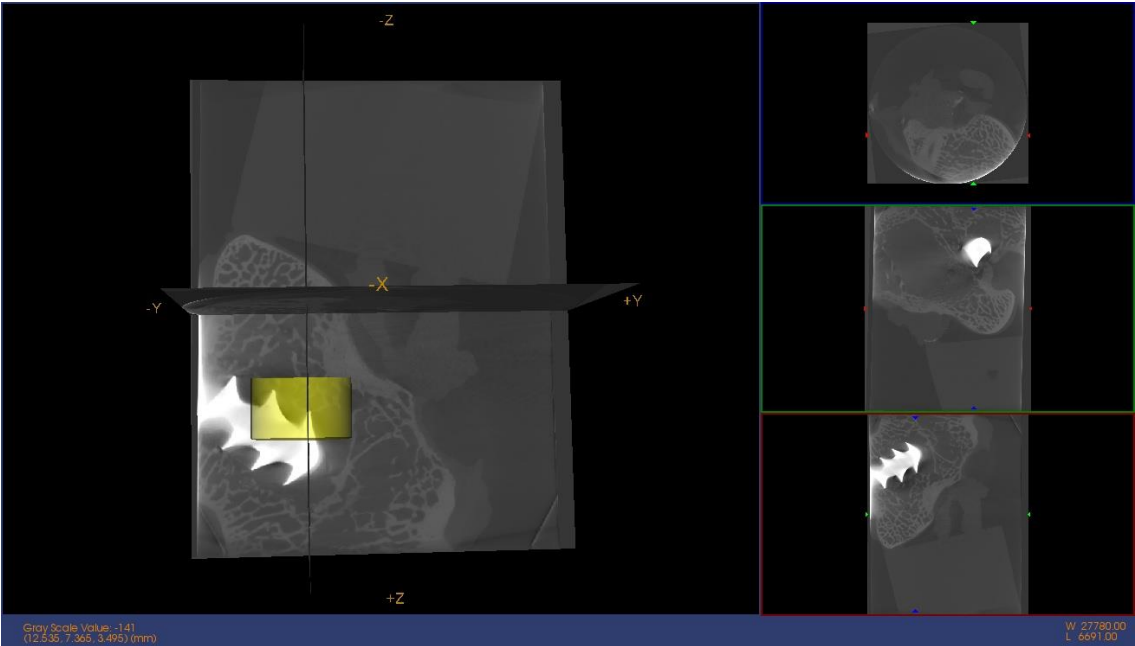


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 3671,5541	Std Dev: 6821,39
Volumen (mm^3): 58,0911	Volumen de Hueso (mm^3): 58,0911
Voxels: 1567800	BMC (mg) 236,6766
BMD (mg/cc): 236,6766	TMC (mg): 1,2276
TMD (mg/cc): 117,9877	BVF: 0,1791

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 48,78	Tb.Sp. 3D (pixels): 76,43
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,626071	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,74522

OHAp-Fn 24h (27)

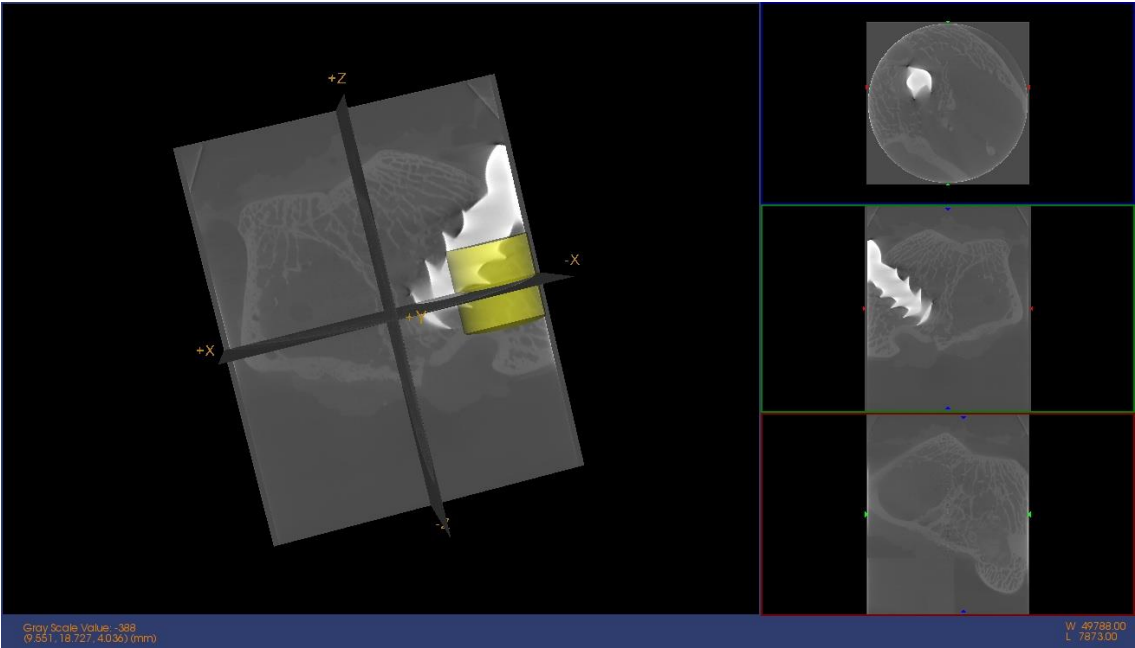


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 5895,1961	Std Dev: 8409,68
Volumen (mm^3): 96,8184	Volumen de Hueso (mm^3): 17,574
Voxels: 2613000	BMC (mg) 41,881
BMD (mg/cc): 432,5727	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF:0,1815

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 59,39	Tb.Sp. 3D (pixels): 94,32
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,980037	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,68556

OHAp-Fn 48h (30)

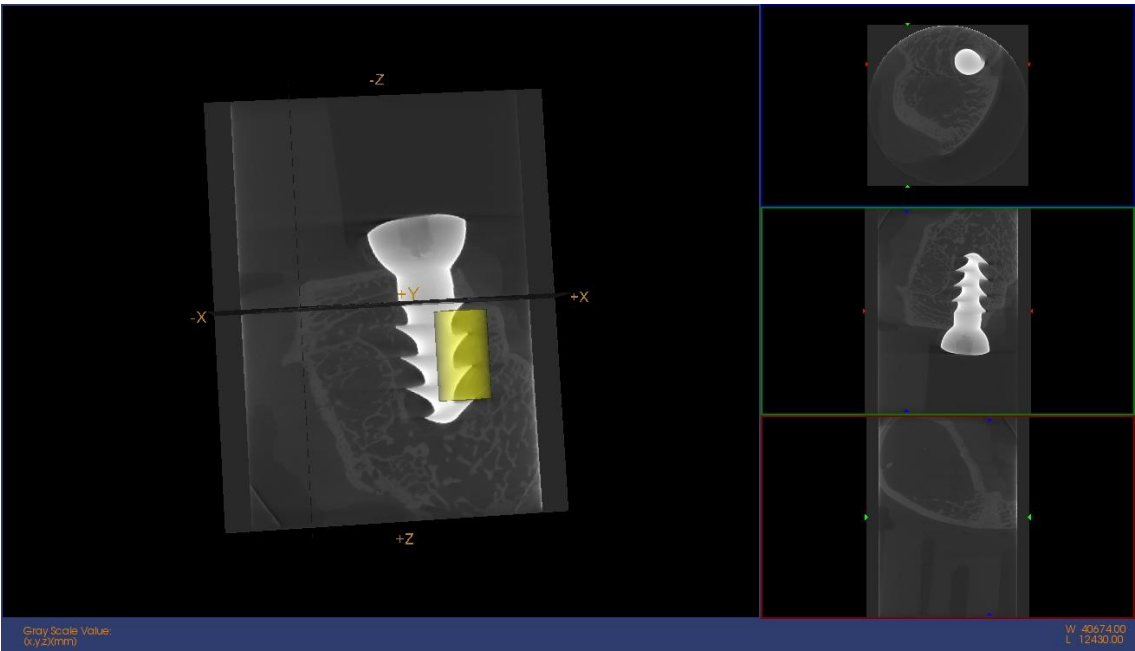


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 9936,2579	Std Dev: 10836,9
Volumen (mm^3): 33,909	Volumen de Hueso (mm^3): 9,9333
Voxels: 915158	BMC (mg) 15,0854
BMD (mg/cc): 444,8794	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,2929

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 29,64	Tb.Sp. 3D (pixels): 41,85
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,988195	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,8605

OHAp-Fn 48h (31)

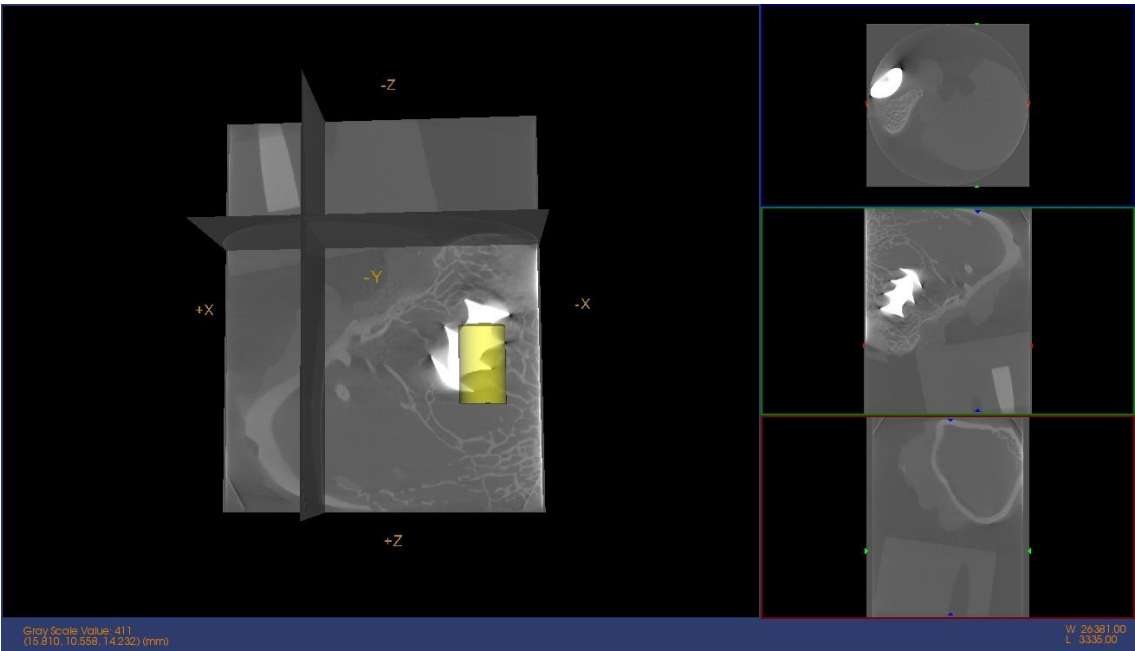


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 9433,1881	Std Dev: 10035,1
Volumen (mm^3): 34,5502	Volumen de Hueso (mm^3): 11,7856
Voxels: 741148	BMC (mg) 13,5932
BMD (mg/cc): 393,4344	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,3411

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 39,33	Tb.Sp. 3D (pixels): 41,37
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,415501	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,85111

OHAp-Fn 48h (32)

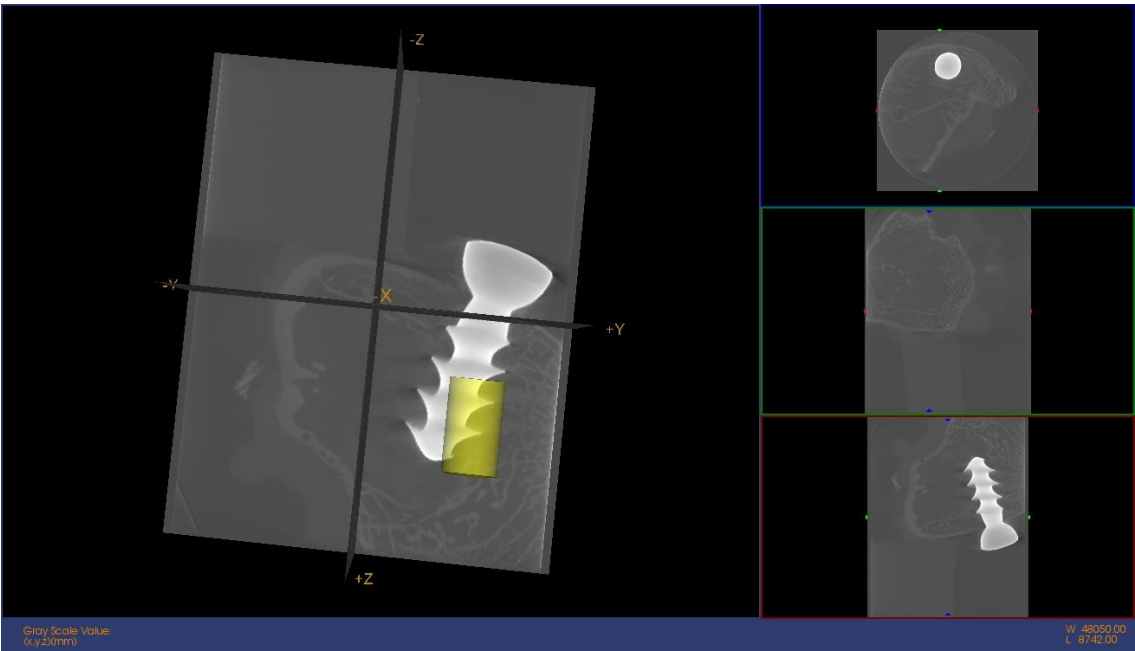


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 8655,8988	Std Dev: 10589,1
Volumen (mm^3): 34,3354	Volumen de Hueso (mm^3): 9,8682
Voxels: 736540	BMC (mg) 12,6093
BMD (mg/cc): 367,2398	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,2874

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 35,21	Tb.Sp. 3D (pixels): 48,87
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,267147	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,82377

OHAp-Fn 5 días (36)

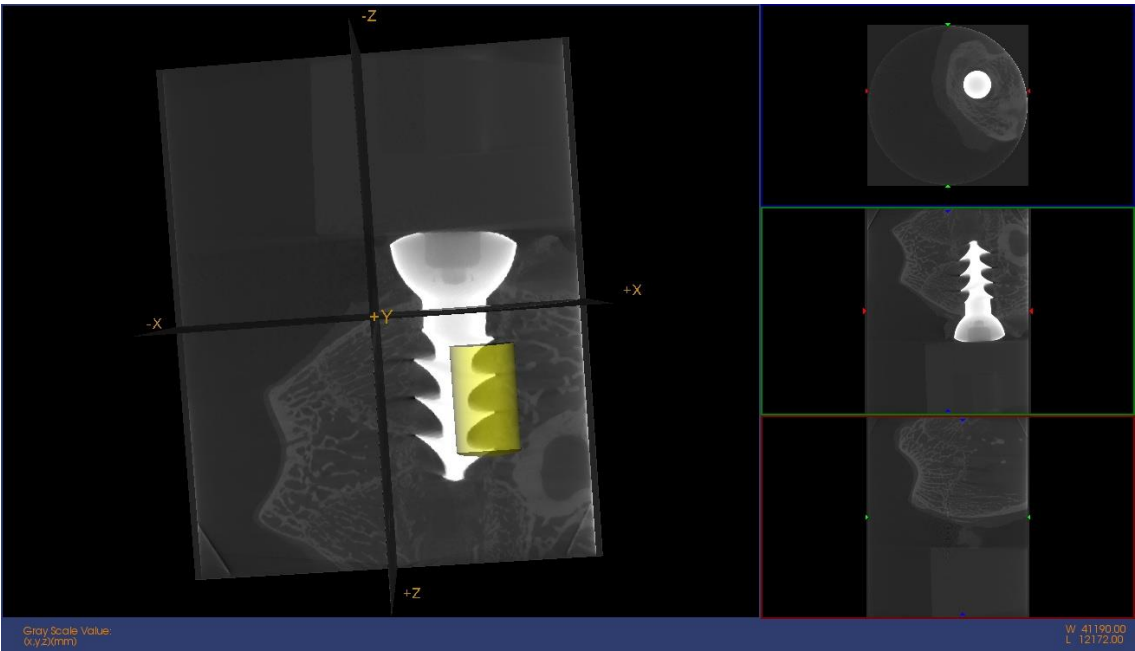


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 9851,1442	Std Dev: 13349,1
Volumen (mm^3): 34,1366	Volumen de Hueso (mm^3): 9,3947
Voxels: 921300	BMC (mg) 8,5979
BMD (mg/cc): 251,8684	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,2726

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 29,57	Tb.Sp. 3D (pixels): 42,31
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,985668	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,85895

OHAp-Fn 5 días (40)

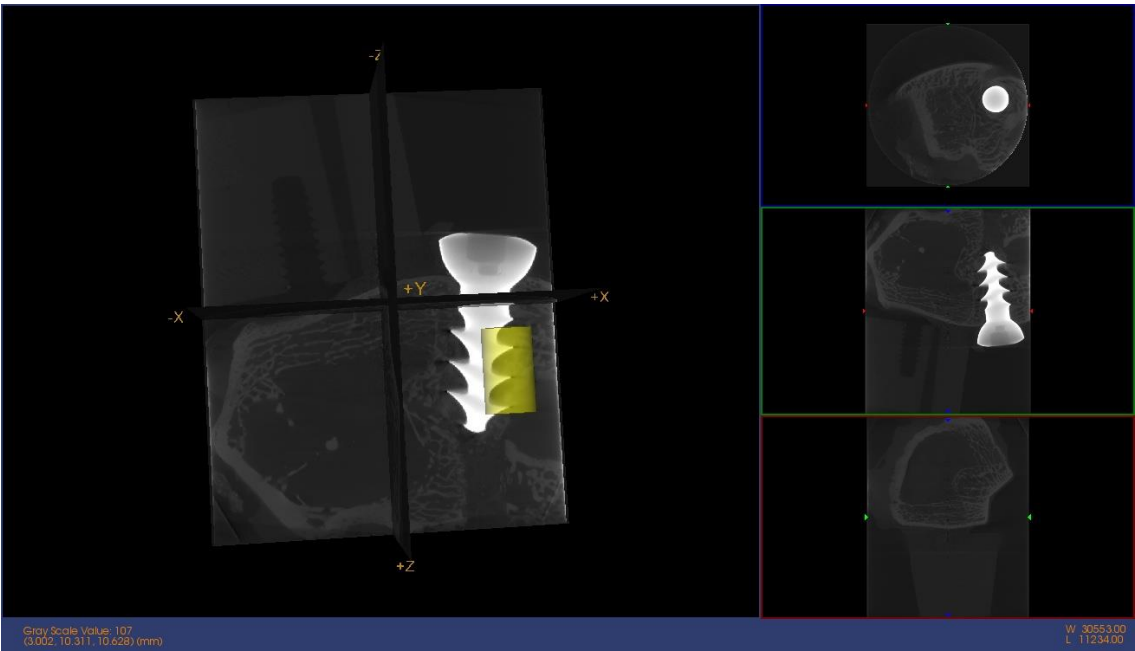


IMAGEN Micro CT

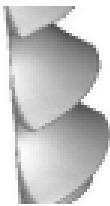


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 6828,2542	Std Dev: 9114,56
Volumen (mm^3): 34,5502	Volumen de Hueso (mm^3): 7,1201
Voxels: 741148	BMC (mg) 16,3279
BMD (mg/cc): 472,5848	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,2061

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 23,19	Tb.Sp. 3D (pixels): 44,37
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,834558	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,8403

OHAp-Fn 5 días (41)

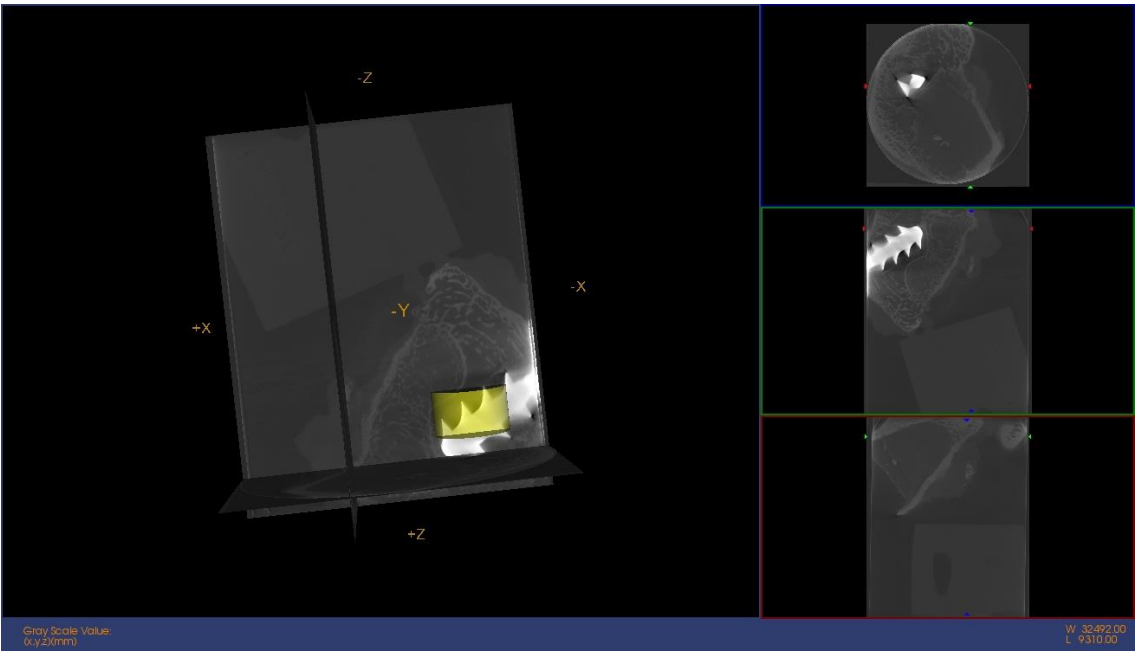


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 6592,0079	Std Dev: 8325,09
Volumen (mm^3): 58,6419	Volumen de Hueso (mm^3): 18,7556
Voxels: 1257948	BMC (mg) 17,8259
BMD (mg/cc): 303,978	TMC (mg): 0,9855
TMD (mg/cc): 0,9855	BVF: 0,3198

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 51,37	Tb.Sp. 3D (pixels): 47,39
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,848932	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,82944

Zona próxima al tornillo (izquierda).

Control 24h (10C)

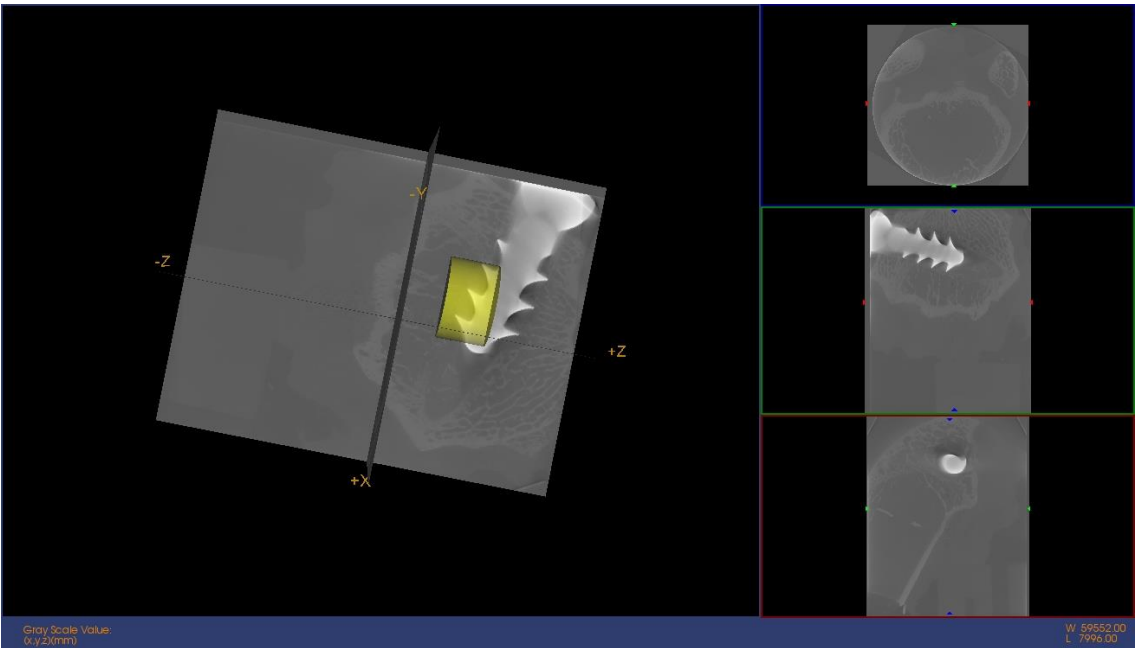


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 5820,2857	Std Dev: 8016,04
Volumen (mm^3): 58,0911	Volumen de Hueso (mm^3): 13,37
Voxels: 1567800	BMC (mg) 14,5031
BMD (mg/cc): 249,6612	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,2302

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 47,54	Tb.Sp. 3D (pixels): 66,27
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,5848	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,7791

Control de 24h (11C)

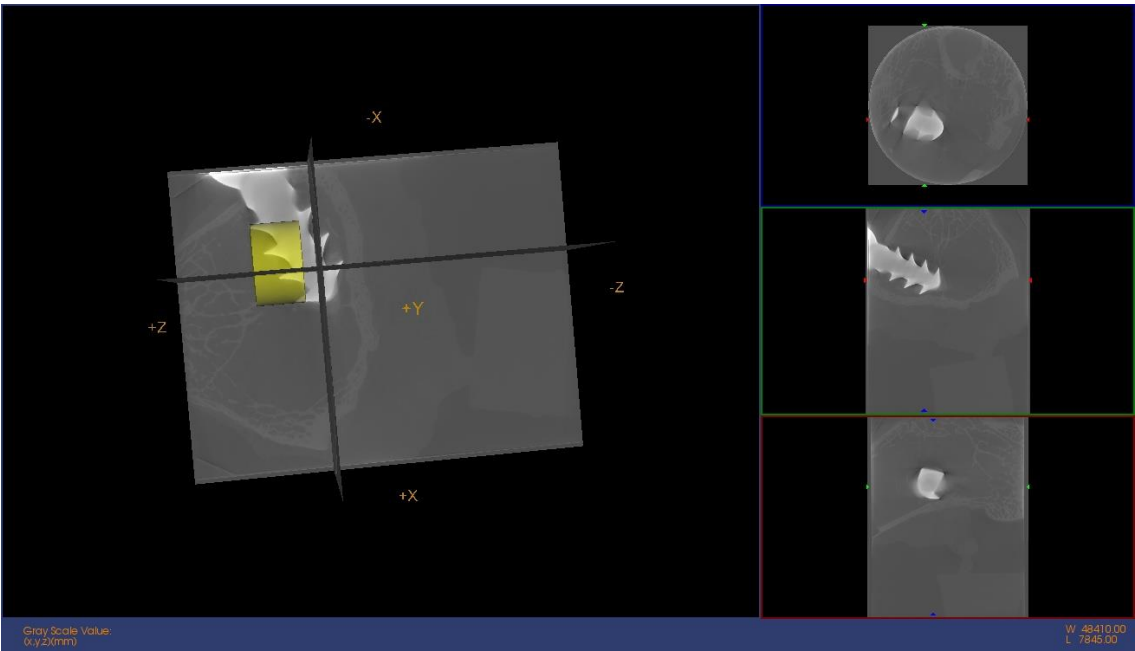


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 3551,6873	Std Dev: 6283,14
Volumen (mm^3): 57,4456	Volumen de Hueso (mm^3): 15,1562
Voxels: 1550380	BMC (mg) 14,0595
BMD (mg/cc): 244,7453	TMC (mg): 6,3772
TMD (mg/cc): 420,7634	BVF: 0,2638

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 55,12	Tb.Sp. 3D (pixels): 64,1
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,837481	Calib. Tb.Sp. 3D (mm):0,7831

Control de 24h (12C)

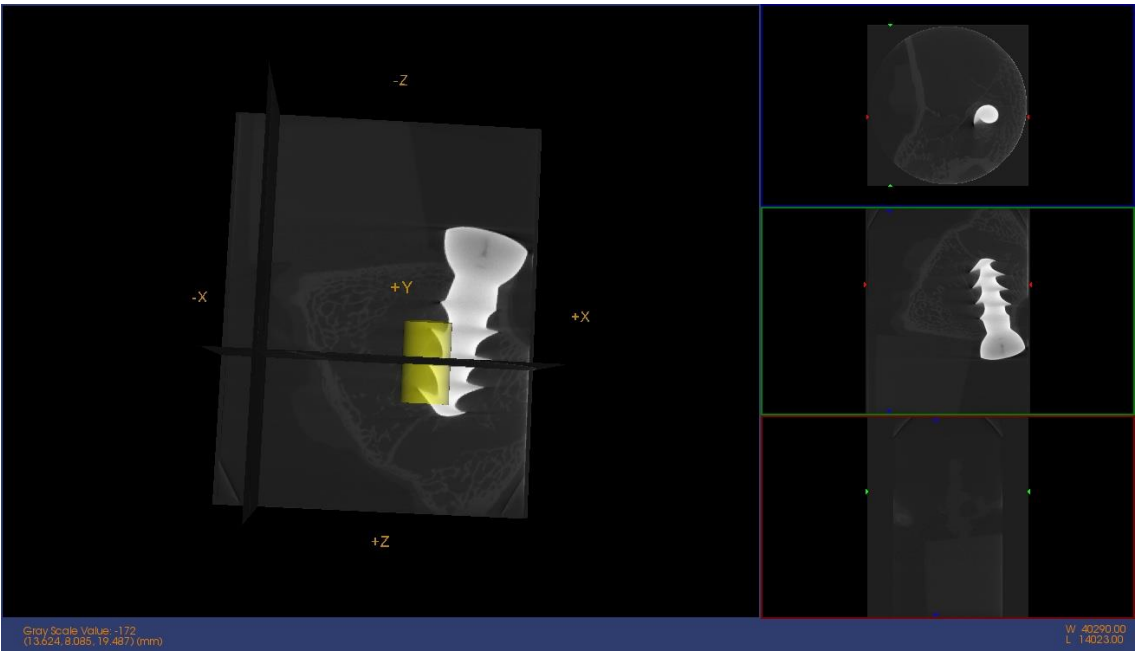


IMAGEN Micro CT

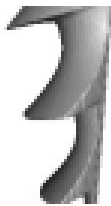


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 6477,7997	Std Dev: 10240,1
Volumen (mm^3):	Volumen de Hueso (mm^3): 6,5567
Voxels: 905473	BMC (mg) 25,4226
BMD (mg/cc): 757,8082	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,1954

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 23,05	Tb.Sp. 3D (pixels): 46,71
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,768418	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,84428

Control 48h (15C)

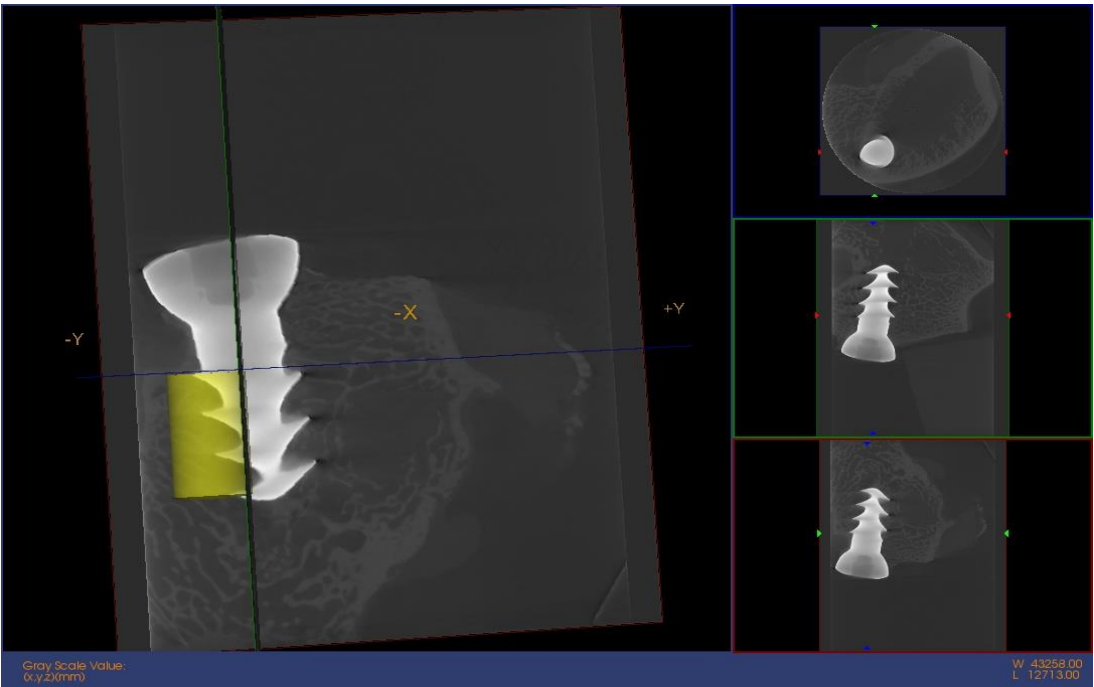


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 6471,5697	Std Dev: 9032,85
Volumen (mm^3): 34,3354	Volumen de Hueso (mm^3): 34,3354
Voxels: 736540	BMC (mg) 14,6287
BMD (mg/cc):426,0541	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,1983

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 26,87	Tb.Sp. 3D (pixels): 46,72
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,967228	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,83185

Control 5 días (2C)

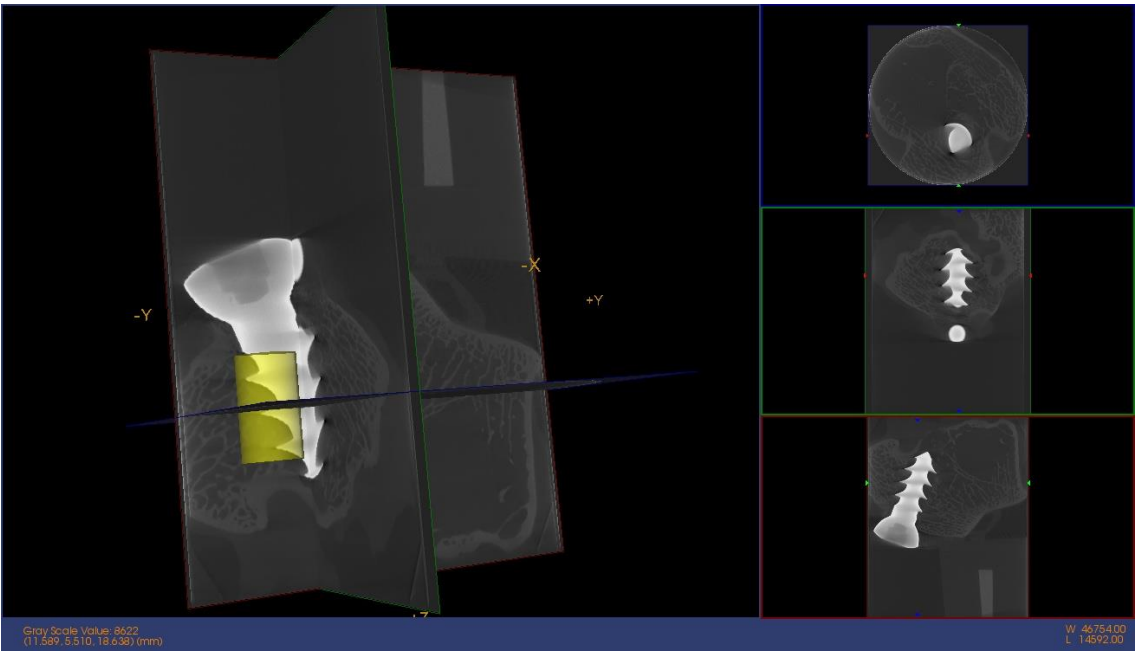


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 10202,393	Std Dev: 11970,8
Volumen (mm^3): 34,7988	Volumen de Hueso (mm^3): 10,8959
Voxels: 746480	BMC (mg) 11,8933
BMD (mg/cc): 341,7741	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,313

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 38,19	Tb.Sp. 3D (pixels): 40,07
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,37435	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,8558

OHAp 24h (1)

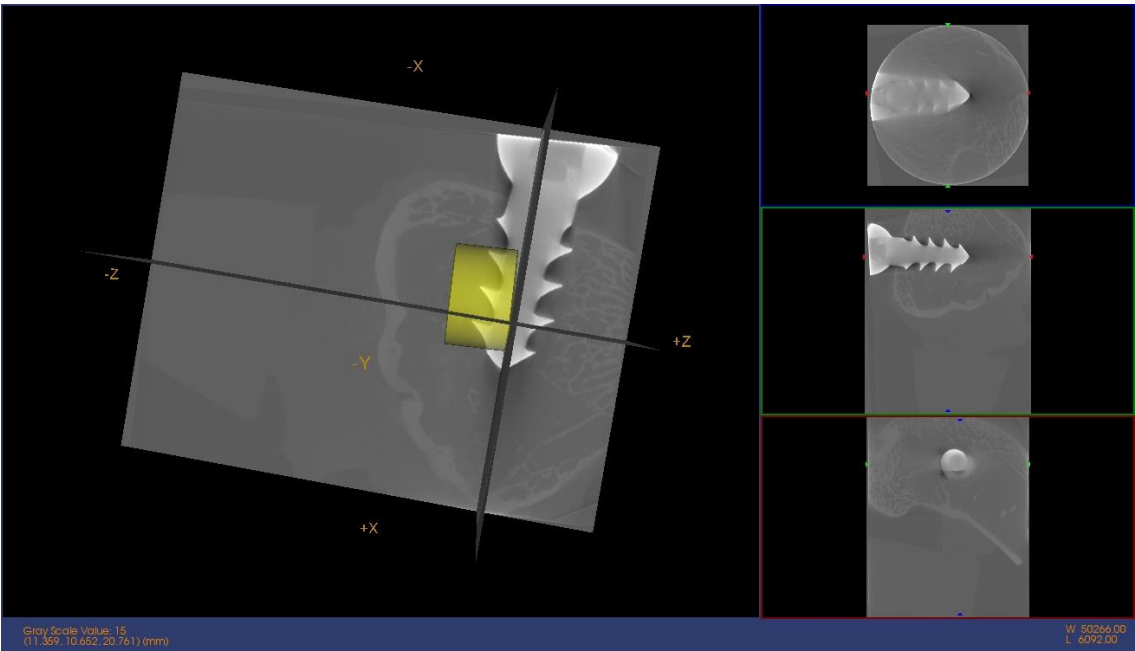


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 3836,7886	Std Dev: 5548,8
Volumen (mm^3): 58,0911	Volumen de Hueso (mm^3): 14,9668
Voxels: 1567800	BMC (mg) 29,2565
BMD (mg/cc): 503,6323	TMC (mg): 9,6294
TMD (mg/cc): 823,4288	BVF: 0,2013

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 38,87	Tb.Sp. 3D (pixels): 69,77
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,229192	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,76741

OHAp 24h (6)

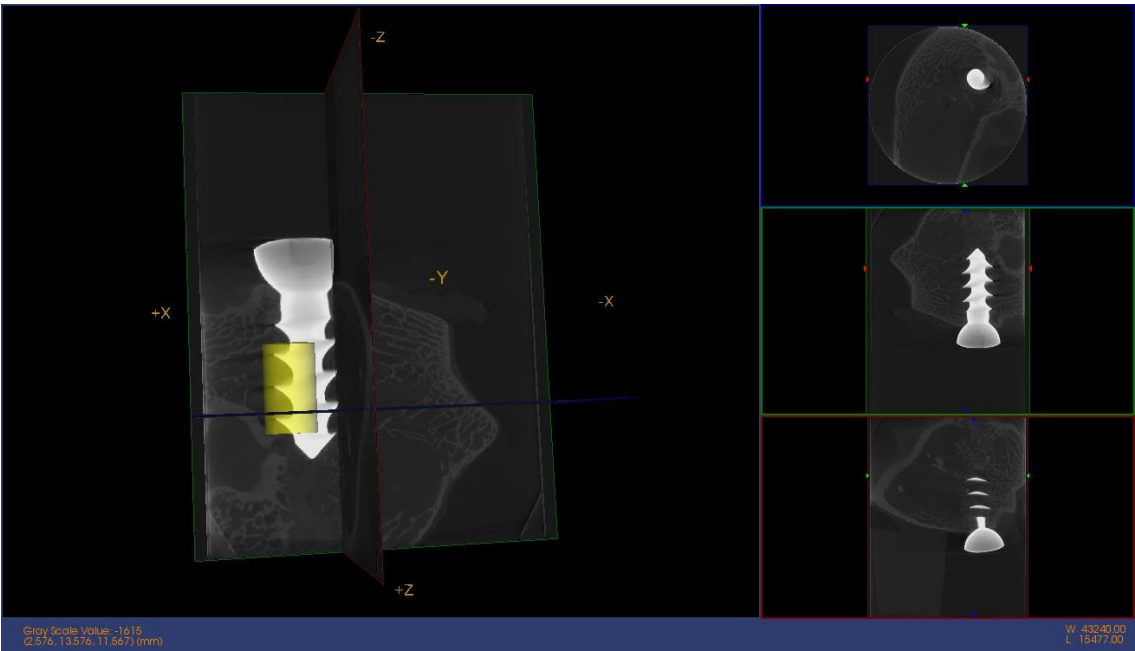


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 15790,749	Std Dev: 13885,4
Volumen (mm^3): 34,5502	Volumen de Hueso (mm^3): 34,5502
Voxels: 741148	BMC (mg) 9,9084
BMD (mg/cc): 286,7834	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,4554

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 35,8	Tb.Sp. 3D (pixels): 26,97
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,288356	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,90294

OHAp 48h (10)

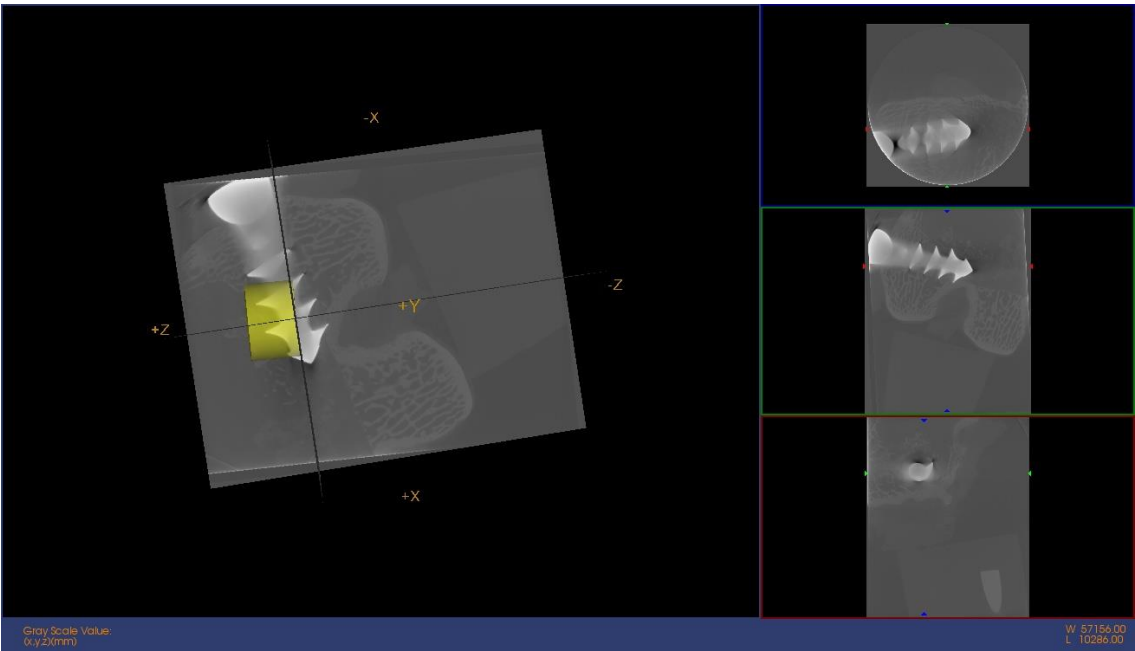


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 5417,3459	Std Dev: 7156,17
Volumen (mm^3): 57,7376	Volumen de Hueso (mm^3): 20,5354
Voxels: 1558260	BMC (mg) 19,1573
BMD (mg/cc): 331,7997	TMC (mg): 7,6402
TMD (mg/cc): 372,0472	BVF: 0,3557

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 65,2	Tb.Sp. 3D (pixels): 52,07
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 2,173701	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,82641

OHAp 48h (14)

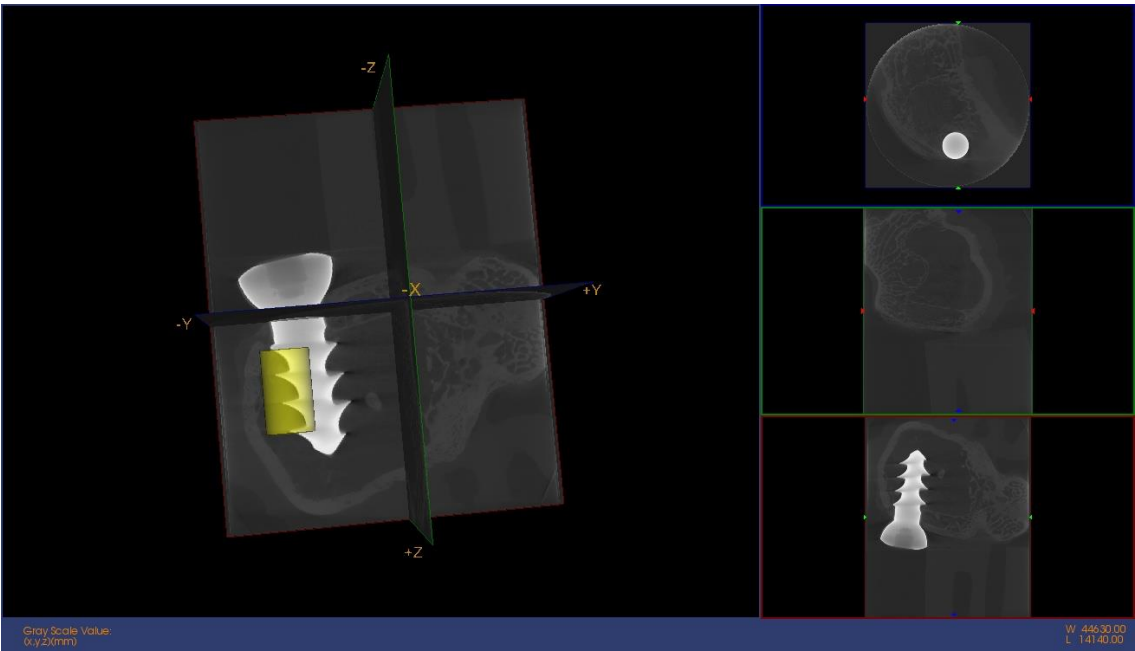


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 8976,1215	Std Dev: 11818,2
Volumen (mm^3): 34,7988	Volumen de Hueso (mm^3): 9,927
Voxels: 746480	BMC (mg) 9,001
BMD (mg/cc): 258,6598	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,2853

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 30,63	Tb.Sp. 3D (pixels): 39,21
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,102482	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,85888

OHAp 5 días (16)

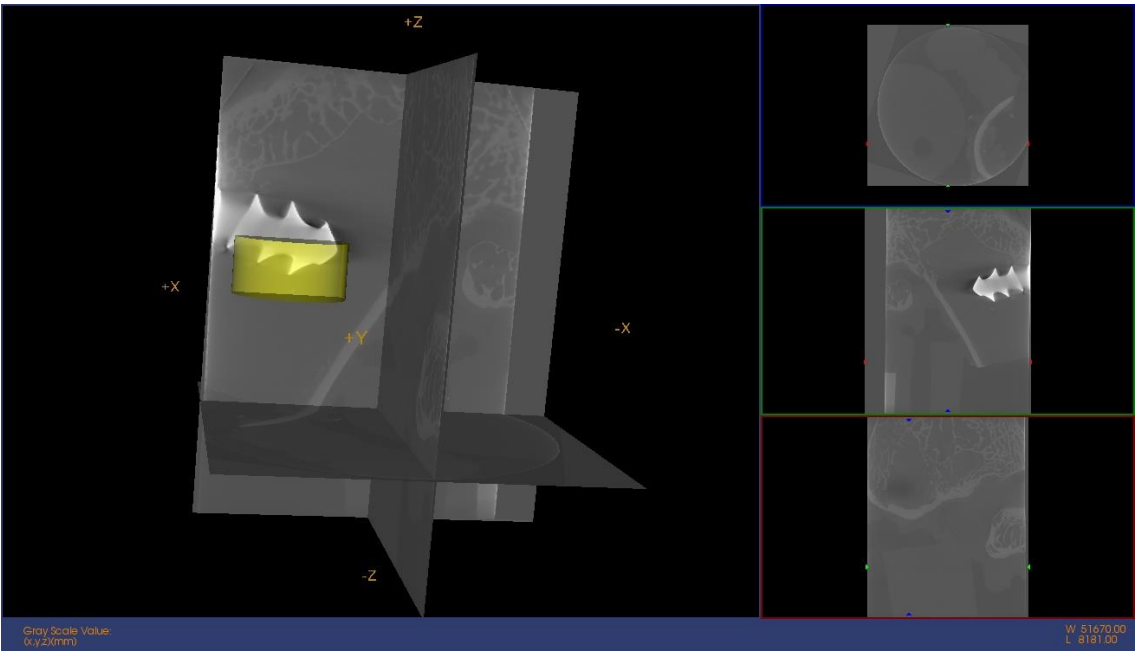


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 4973,4669	Std Dev: 7645,13
Volumen (mm^3): 69,0666	Volumen de Hueso (mm^3): 69,0666
Voxels: 1864016	BMC (mg) 15,296
BMD (mg/cc): 221,4673	TMC (mg): 0,2391
TMD (mg/cc): 16,3406	BVF: 0,2118

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 55,91	Tb.Sp. 3D (pixels): 70,71
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,864038	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,76427

OHAp 5 días (21)

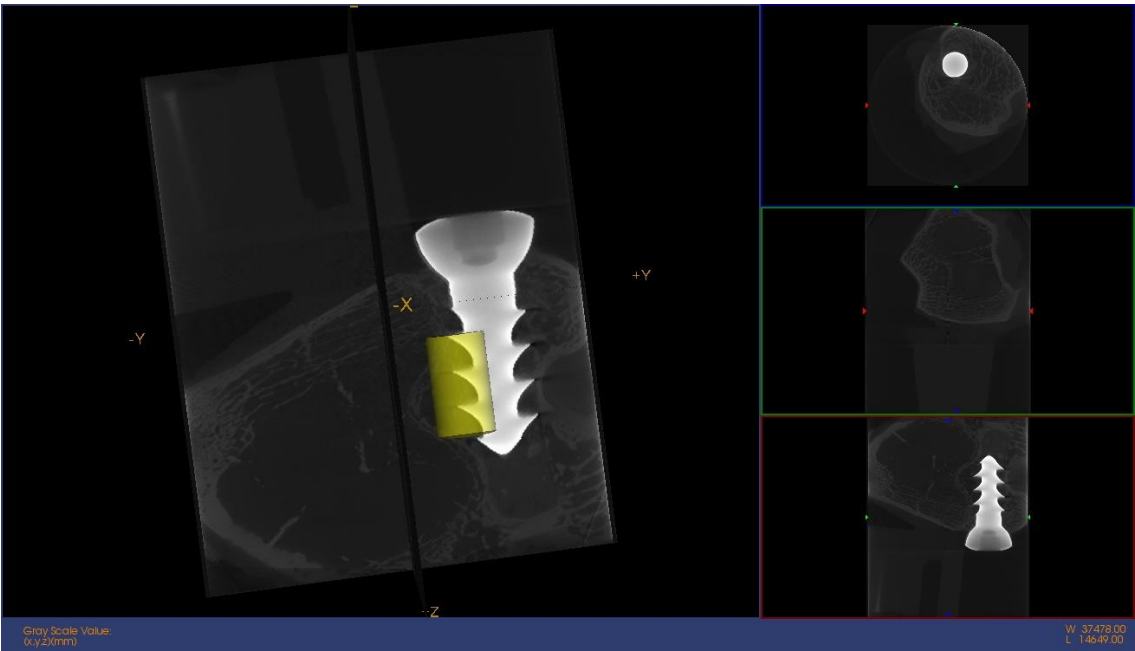


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 7156,0415	Std Dev: 10801,9
Volumen (mm^3): 34,5502	Volumen de Hueso (mm^3): 7,8421
Voxels: 741148	BMC (mg) 8,1518
BMD (mg/cc): 235,9691	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,227

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 23,33	Tb.Sp. 3D (pixels): 44,67
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,839546	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,83923

OHAp-Fn 24h (24)

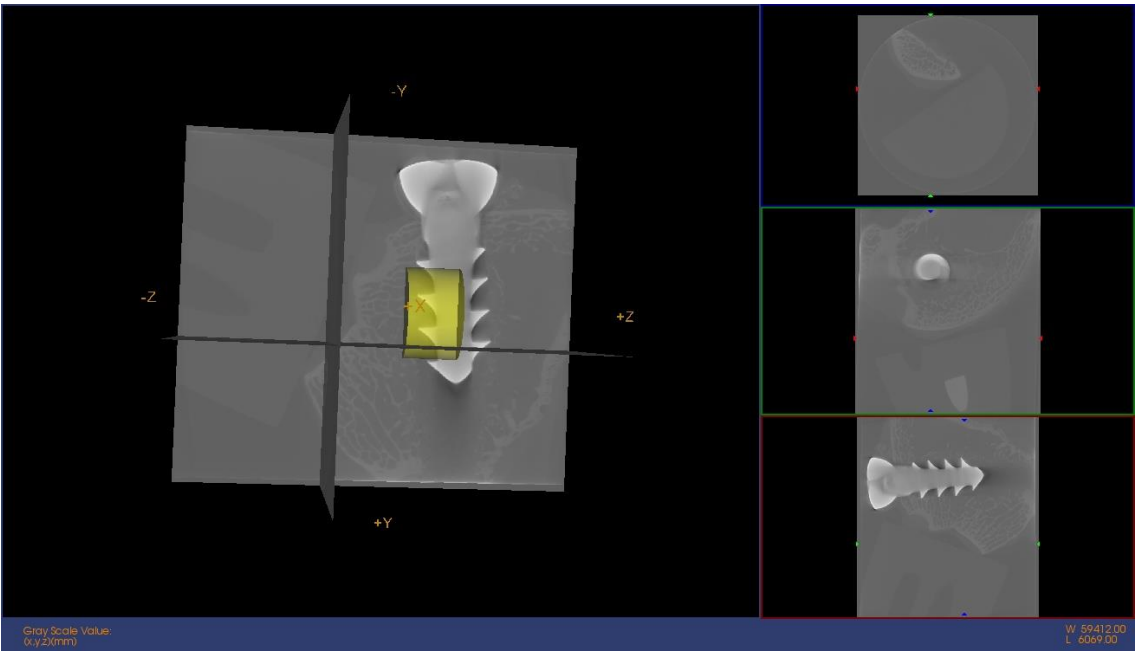


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 4654,287	Std Dev: 5203,65
Volumen (mm^3): 57,096	Volumen de Hueso (mm^3): 23,8107
Voxels: 1540946	BMC (mg) 47,2777
BMD (mg/cc): 828,0389	TMC (mg): 35,8154
TMD (mg/cc): 1504,1728	BVF:0,4117

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 62,15	Tb.Sp. 3D (pixels): 55,46
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 2,07183	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,8151

OHAp-Fn 24h (26)

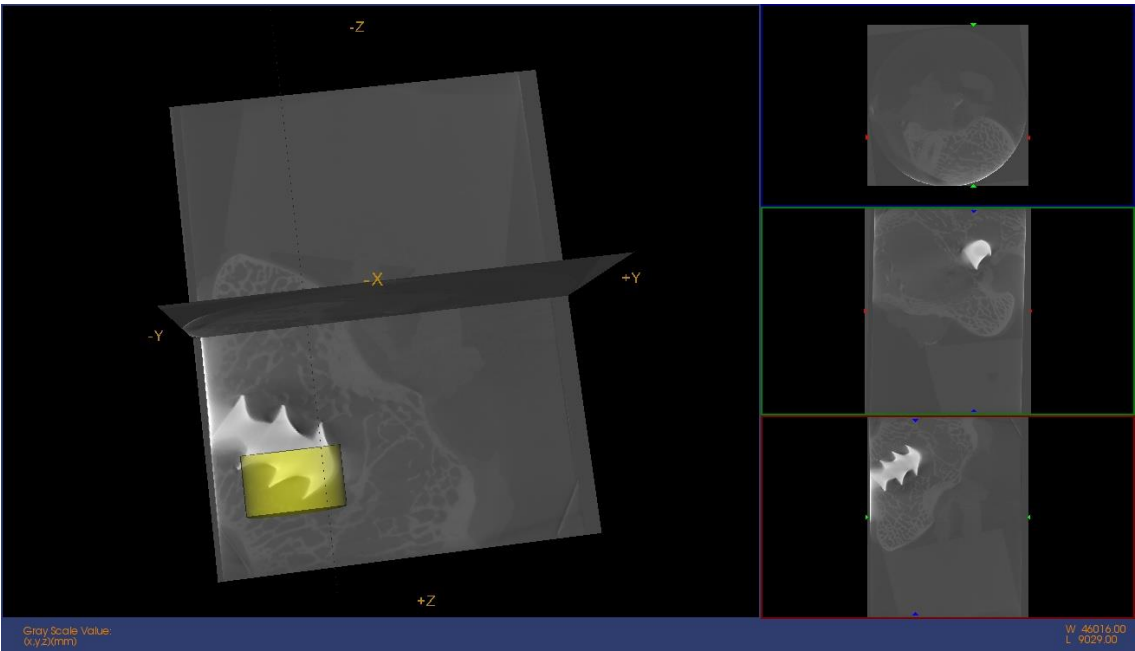


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 6929,3387	Std Dev: 8133,87
Volumen (mm^3): 57,3341	Volumen de Hueso (mm^3): 15,4516
Voxels: 1547370	BMC (mg) 26,0258
BMD (mg/cc): 453,932	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,2695

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 57,81	Tb.Sp. 3D (pixels): 56,07
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,927416	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,81309

OHAp-Fn 24h (27)

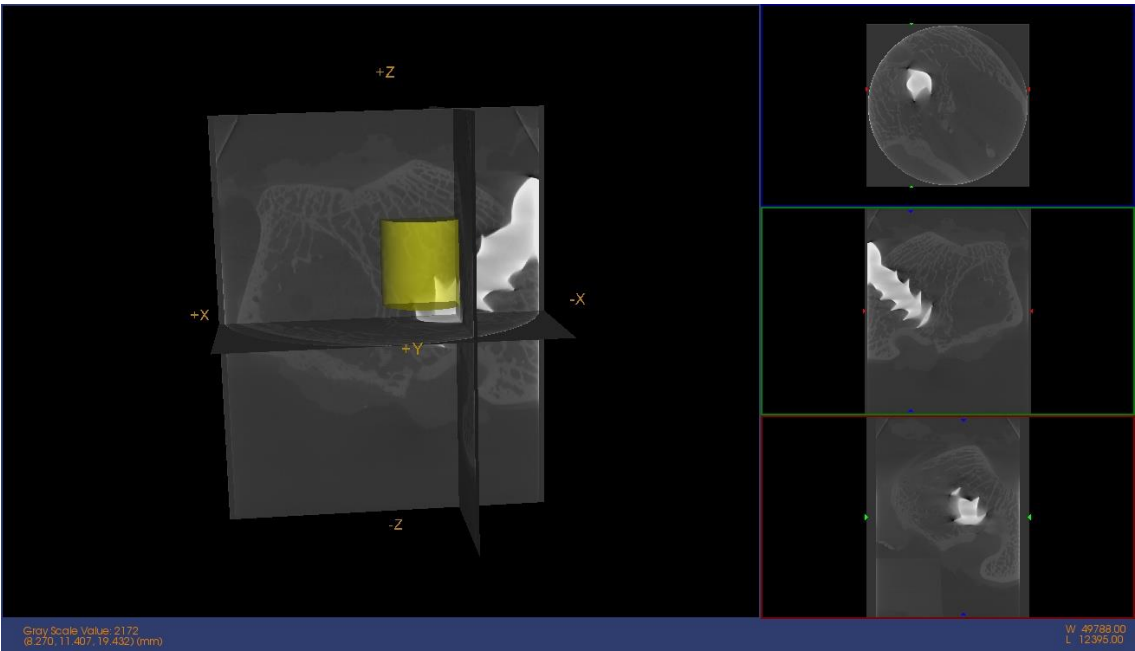


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 1380,9056	Std Dev: 6185,54
Volumen (mm^3): 96,2293	Volumen de Hueso (mm^3): 6,0703
Voxels: 2597100	BMC (mg) 9,7145
BMD (mg/cc): 100,9518	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,0631

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 35,42	Tb.Sp. 3D (pixels): 119,5
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,180825	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,60163

OHAp-Fn 48h (30)

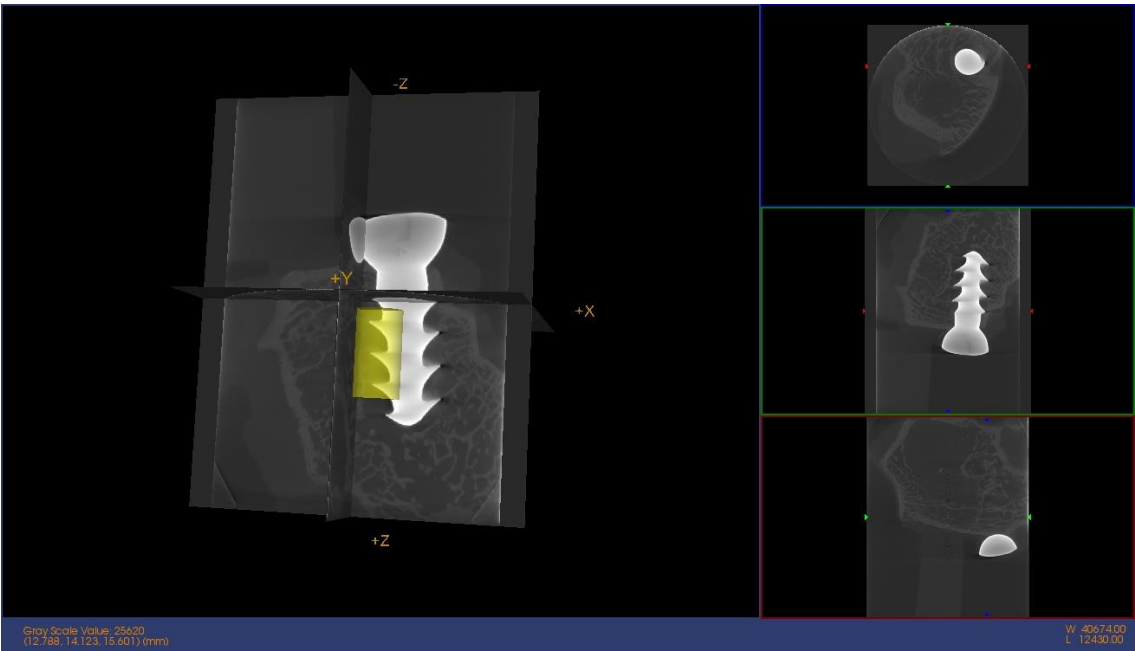


IMAGEN Micro CT

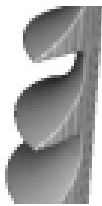


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 6256,604	Std Dev: 9639,03
Volumen (mm^3): 34,1366	Volumen de Hueso (mm^3): 6,7306
Voxels: 921300	BMC (mg) 9,6294
BMD (mg/cc): 282,0849	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,1972

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 24,43	Tb.Sp. 3D (pixels): 47,54
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,814431	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,8415

OHAp-Fn 48h (31)

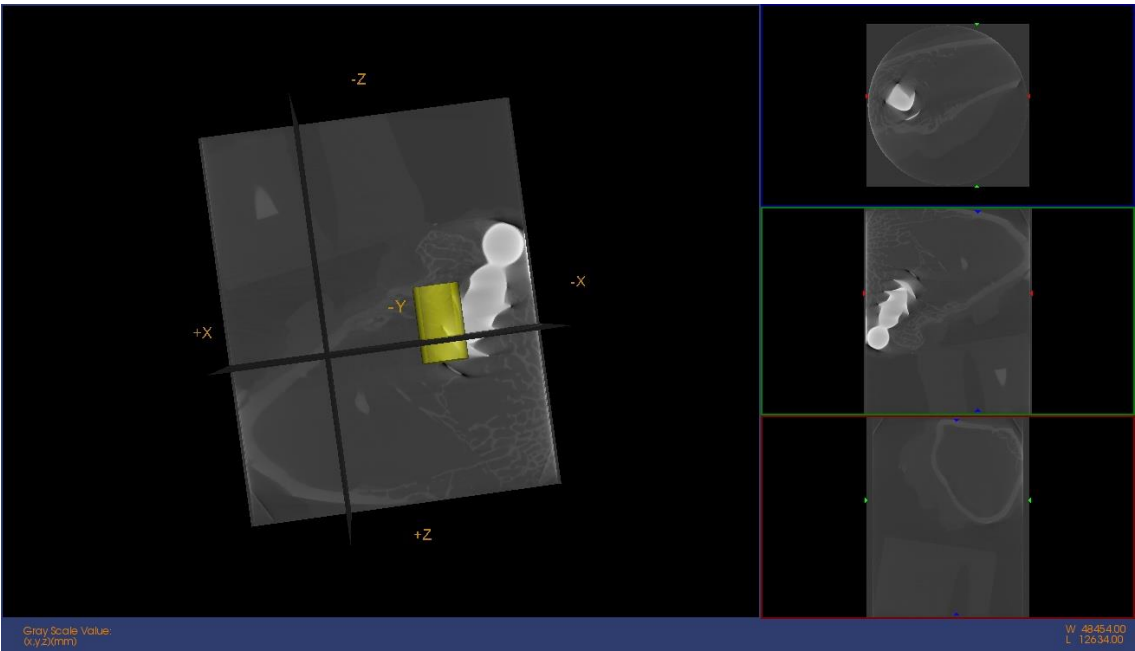


IMAGEN Micro CT

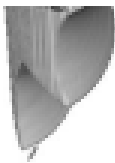


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 4404,4161	Std Dev: 7741,42
Volumen (mm^3): 34,9131	Volumen de Hueso (mm^3): 5,2996
Voxels: 748932	BMC (mg) 10,1053
BMD (mg/cc): 289,4416	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,1518

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 30,2	Tb.Sp. 3D (pixels): 59,04
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,086966	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,77851

OHAp-Fn 48h (32)

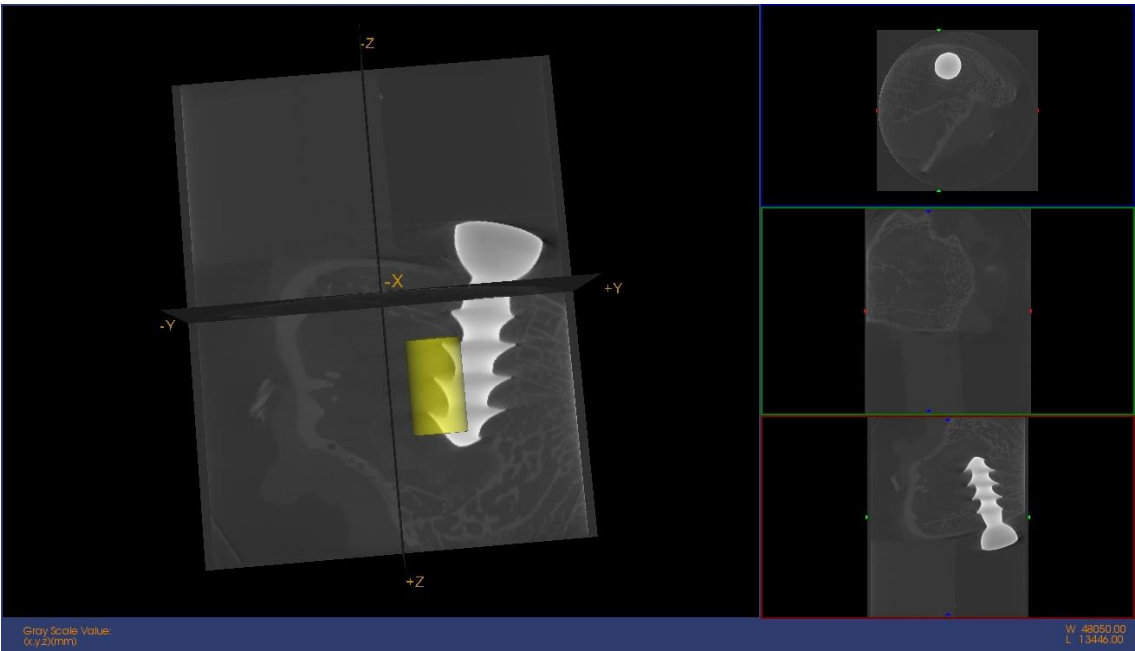


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 6393,7087	Std Dev: 9603,51
Volumen (mm^3): 34,0901	Volumen de Hueso (mm^3): 7,0974
Voxels: 731279	BMC (mg) 10,9406
BMD (mg/cc): 320,9323	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,2082

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 25,44	Tb.Sp. 3D (pixels): 43,58
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,91547	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,84136

OHAp-Fn 5 días (36)

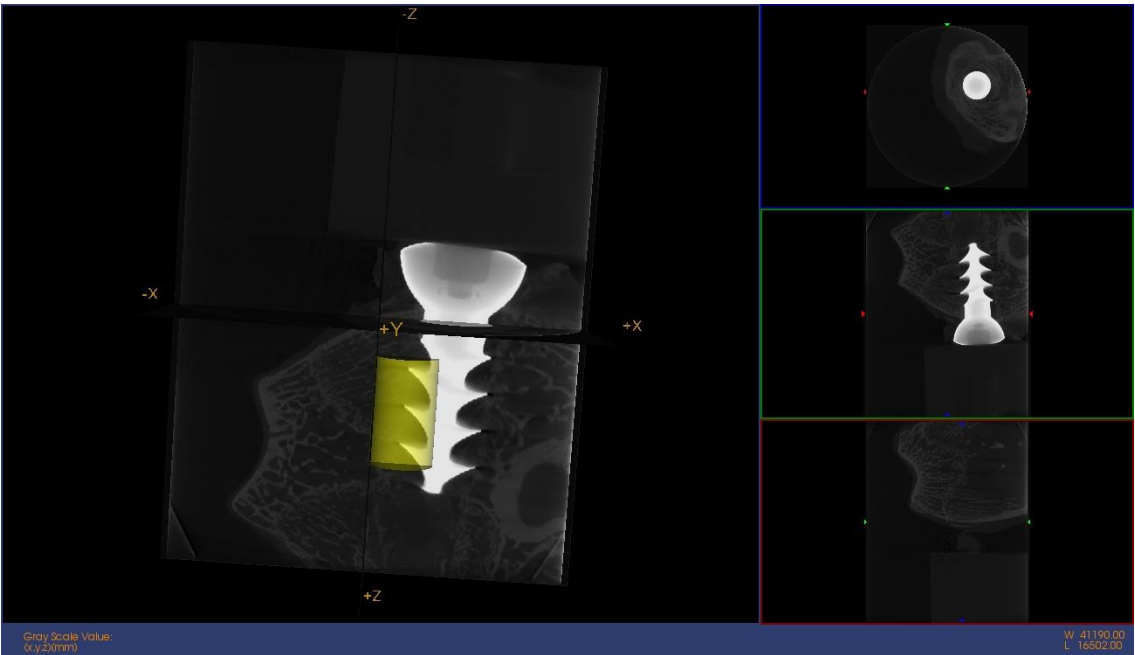


IMAGEN Micro CT

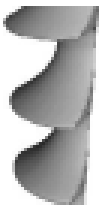


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 6231,547	Std Dev: 11206,2
Volumen (mm^3): 34,1366	Volumen de Hueso (mm^3): 5,7665
Voxels: 921300	BMC (mg) 7,4753
BMD (mg/cc): 218,9828	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,1689

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 20,32	Tb.Sp. 3D (pixels): 49,94
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,677265	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,83351

OHAp-Fn 5 días (40)

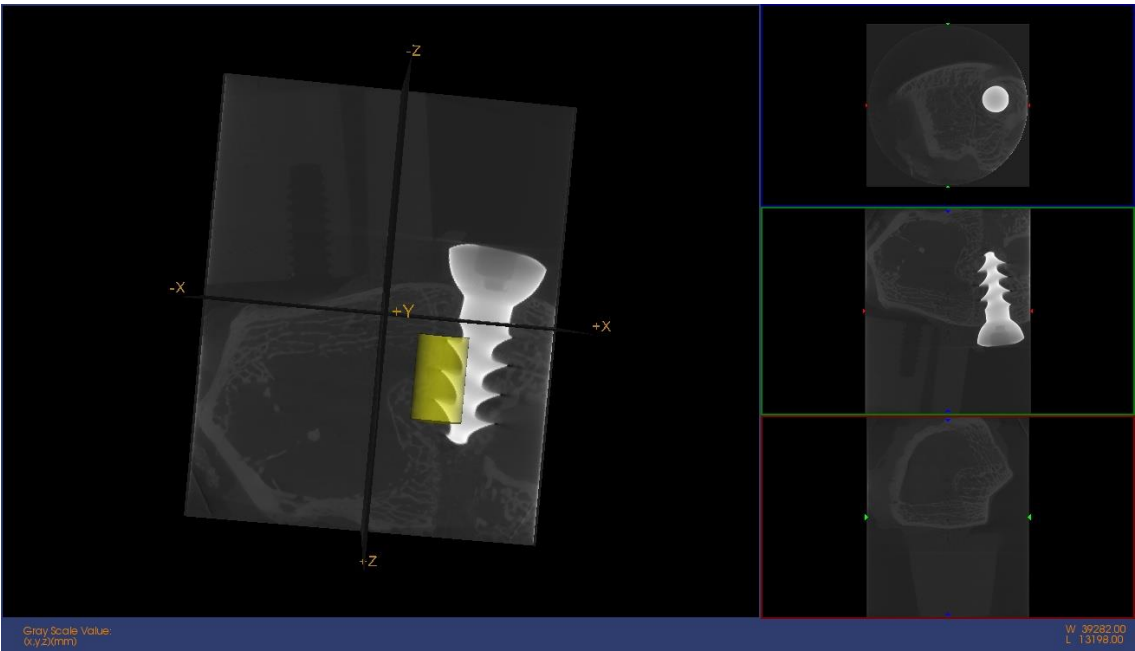


Fig.5.117 IMAGEN Micro CT

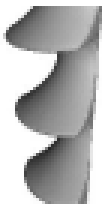


Fig.5.118 IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 5257,9303	Std Dev: 8461,16
Volumen (mm^3): 34,5502	Volumen de Hueso (mm^3): 5,7905
Voxels: 741148	BMC (mg) 11,7193
BMD (mg/cc): 339,1965	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF:0,1676

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 19,13	Tb.Sp. 3D (pixels): 48,25
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,688359	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,82664

OHAp-Fn 5 días (41)

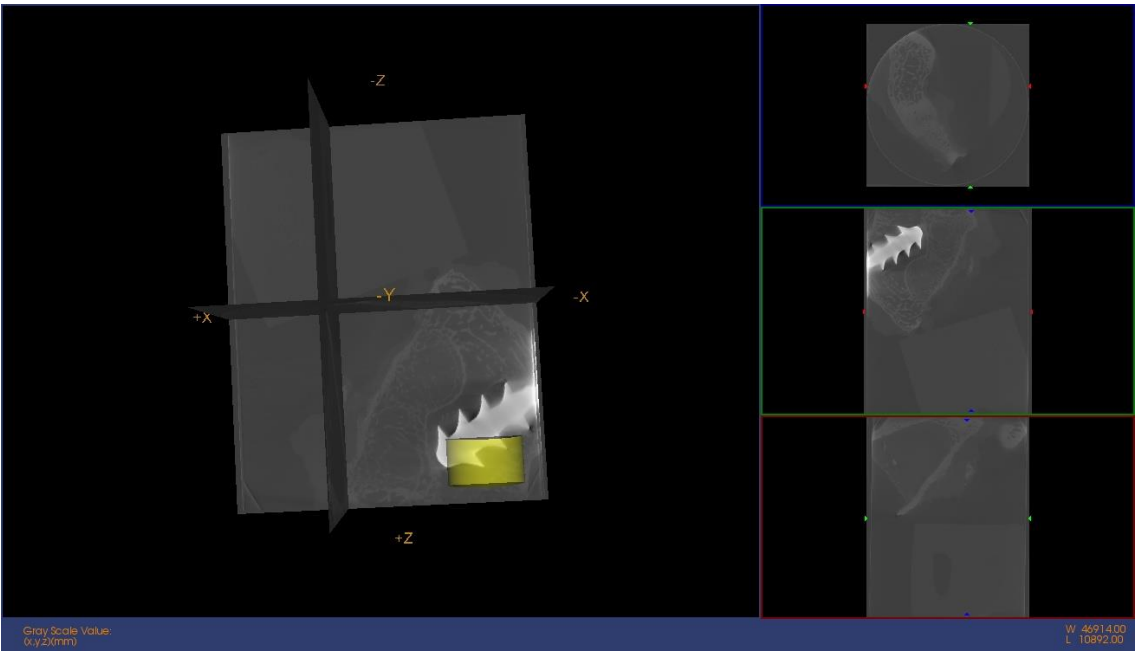


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 5559,8194	Std Dev: 7237,41
Volumen (mm^3): 58,9725	Volumen de Hueso (mm^3): 11,8971
Voxels: 1265040	BMC (mg) 26,4399
BMD (mg/cc): 448,3418	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,2017

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 48,39	Tb.Sp. 3D (pixels): 63,81
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,741484	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,77035

Zona próxima al tornillo (inferior)

Control de 24 (10C)

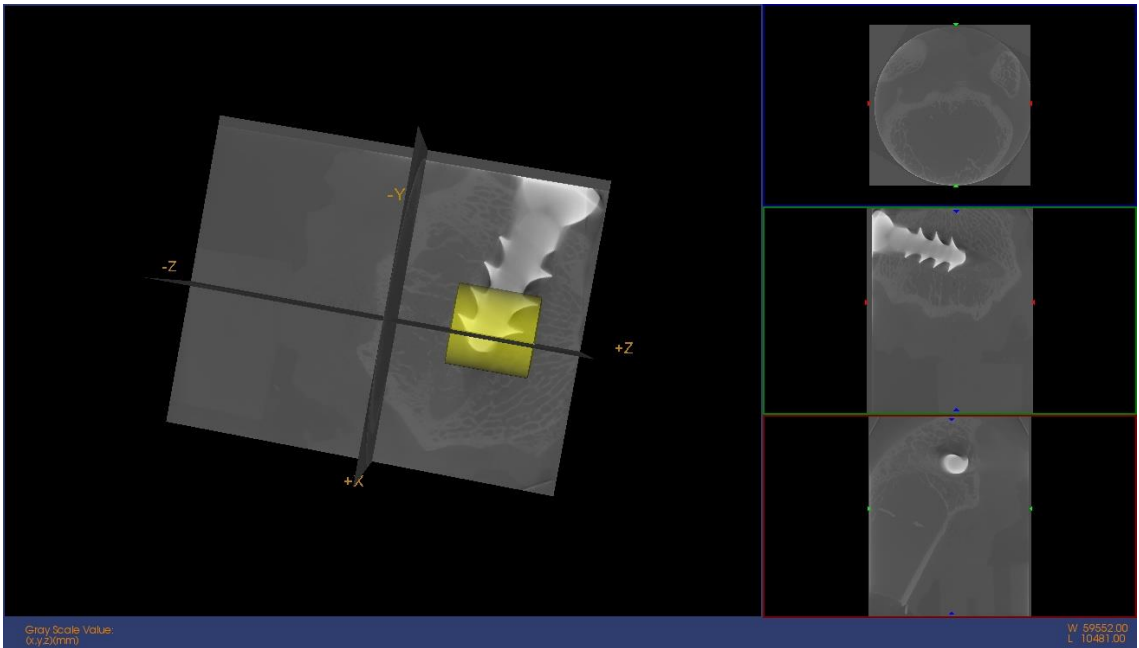


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 5271,5196	Std Dev:8515,89
Volumen (mm^3): 94,9197	Volumen de Hueso (mm^3): 24,0092
Voxels: 25611757	BMC (mg) 18,2354
BMD (mg/cc): 192,1136	TMC (mg): 0,3921
TMD (mg/cc): 16,3313	BVF: 0,2529

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 51,23	Tb.Sp. 3D (pixels): 57,68
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,707979	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,8077

Control de 24h (11C)

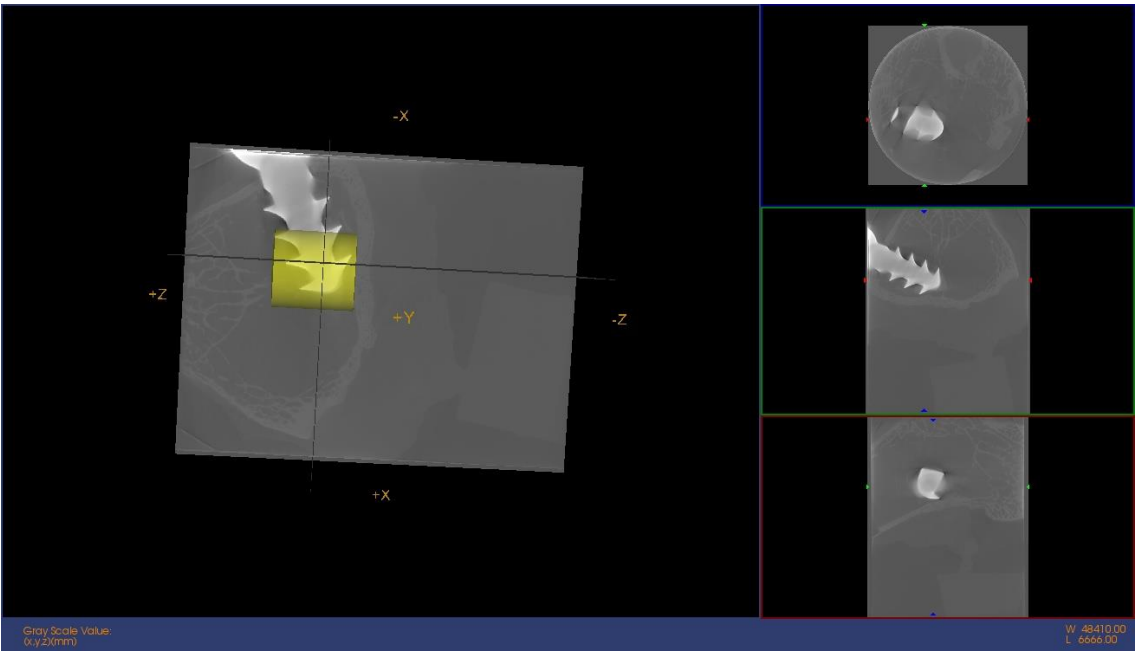


IMAGEN Micro CT

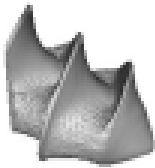


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media:4646,4841	Std Dev:7118,2
Volumen (mm^3):96,2293	Volumen de Hueso (mm^3): 27,522
Voxels:2597100	BMC (mg) 27,1405
BMD (mg/cc): 282,0404	TMC (mg): 7,7407
TMD (mg/cc): 281,254	BVF: 0,286

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 53,05	Tb.Sp. 3D (pixels): 51,66
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,768474	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,82777

Control de 24h (12C)

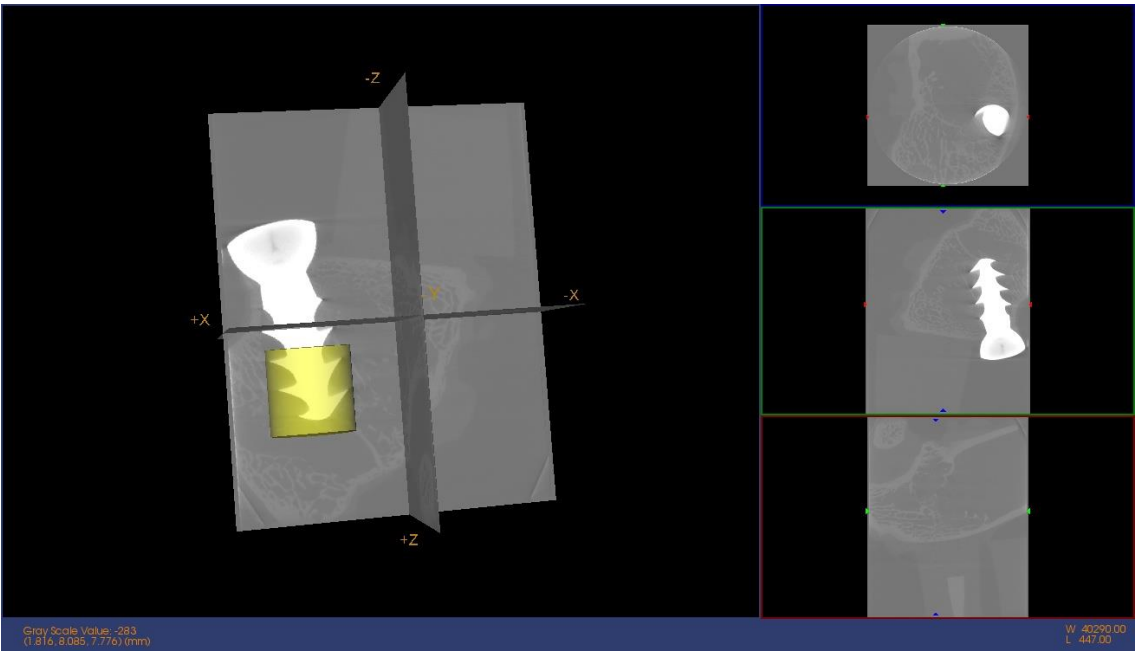


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 7233,6785	Std Dev: 10942,5
Volumen (mm^3): 95,5878	Volumen de Hueso (mm^3): 21,7866
Voxels: 2579786	BMC (mg) 60,0438
BMD (mg/cc): 628,1533	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,2279

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 49,84	Tb.Sp. 3D (pixels): 45,03
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,661596	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,84988

Control de 48h (15C)

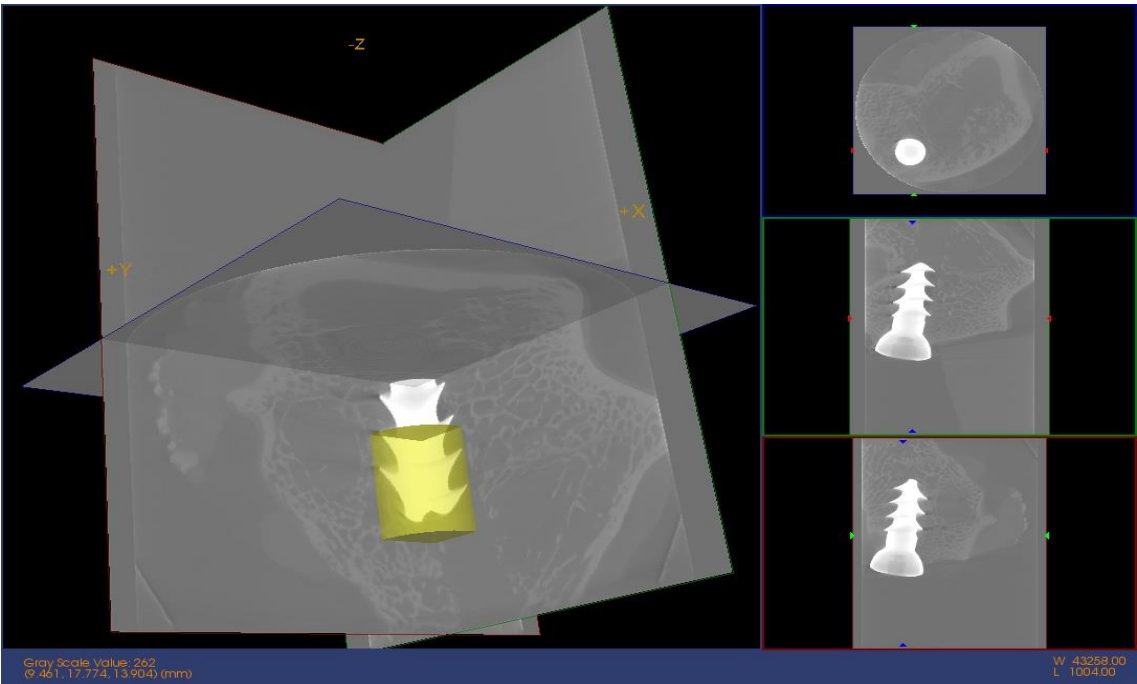


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 6590,7704	Std Dev: 9724,79
Volumen (mm^3): 98,9141	Volumen de Hueso (mm^3): 20,6846
Voxels: 2121840	BMC (mg) 34,1678
BMD (mg/cc): 345,4293	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF:0,209

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 50,94	Tb.Sp. 3D (pixels): 50,11
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,833428	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,81965

Control 5 días (2C)

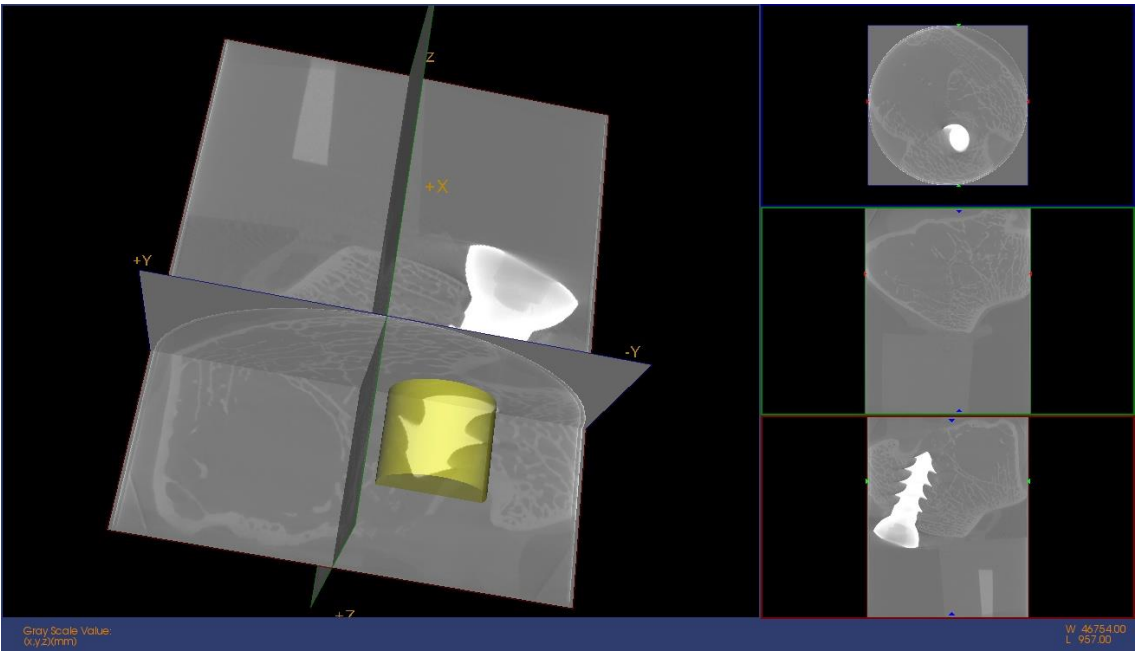


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 7200,7536	Std Dev: 10851,4
Volumen (mm^3): 96,8662	Volumen de Hueso (mm^3): 19,7189
Voxels: 2077911	BMC (mg) 29,9155
BMD (mg/cc): 308,8328	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,2038

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 47,67	Tb.Sp. 3D (pixels): 53,43
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,715733	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,80772

OHAp 24h (1)

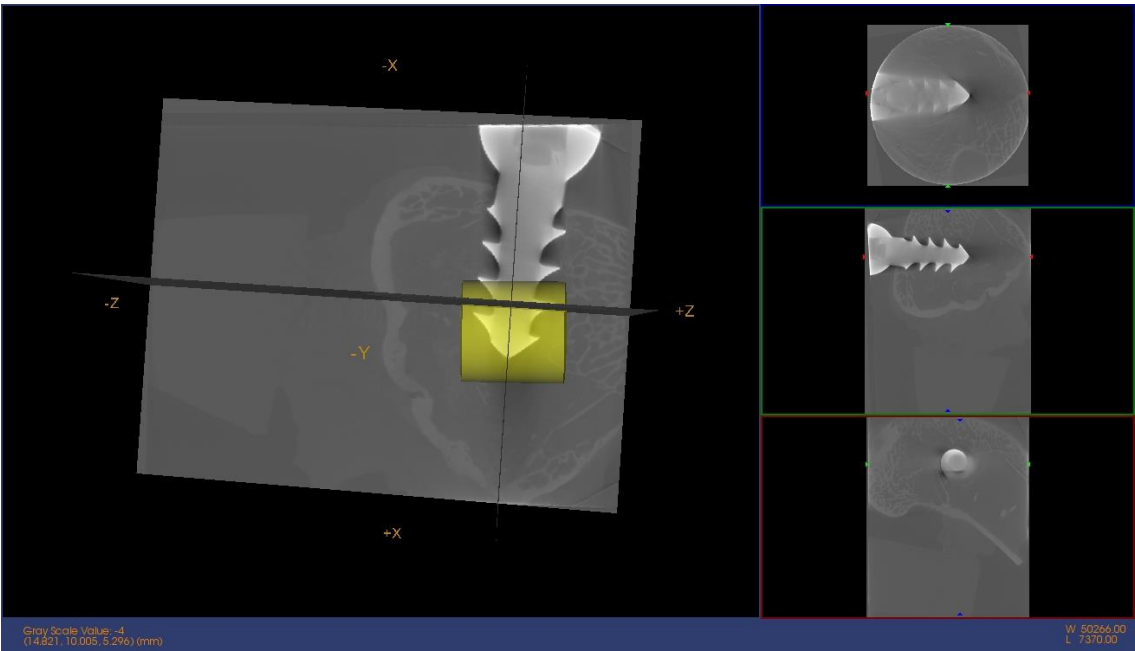


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 2914,2762	Std Dev: 6059,16
Volumen (mm^3): 95,5878	Volumen de Hueso (mm^3): 19,3098
Voxels: 2579786	BMC (mg) 29,7857
BMD (mg/cc): 311,6058	TMC (mg): 13,6395
TMD (mg/cc): 706,3497	BVF: 0,202

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 50,77	Tb.Sp. 3D (pixels): 65,79
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,69242	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,78068

OHAp 24h (6)

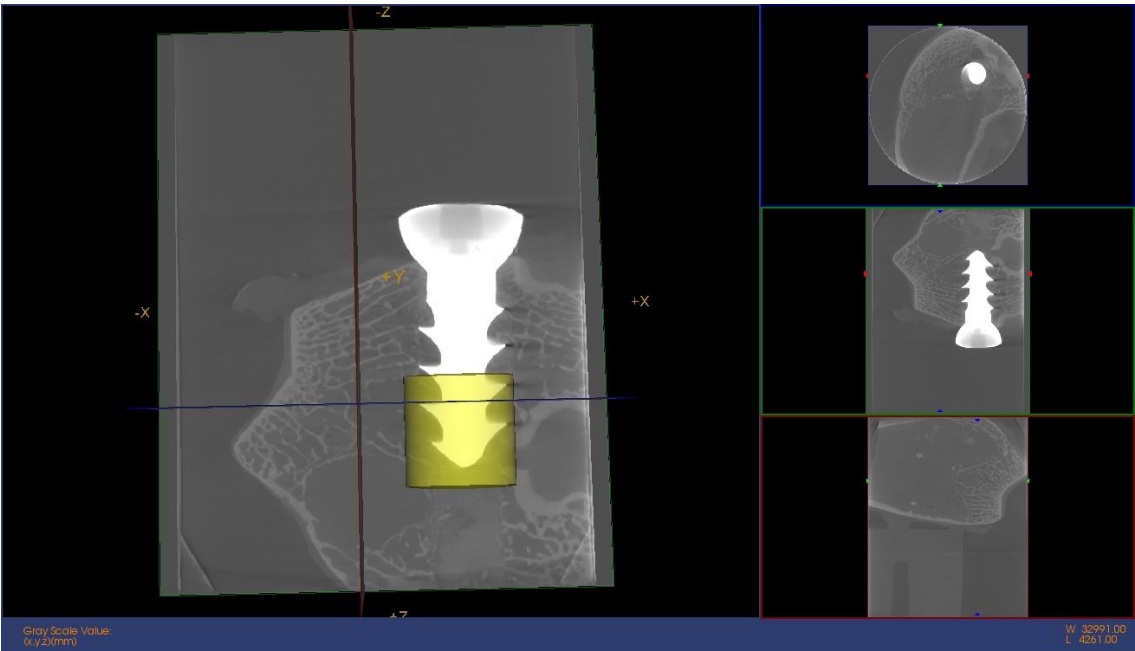


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 7064,4369	Std Dev: 11629,2
Volumen (mm^3): 97,5855	Volumen de Hueso (mm^3): 18,6912
Voxels: 2093340	BMC (mg) 21,9085
BMD (mg/cc): 224,5052	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,1915

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 49,04	Tb.Sp. 3D (pixels): 47,64
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,764899	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,82854

OHAp 48h (10)

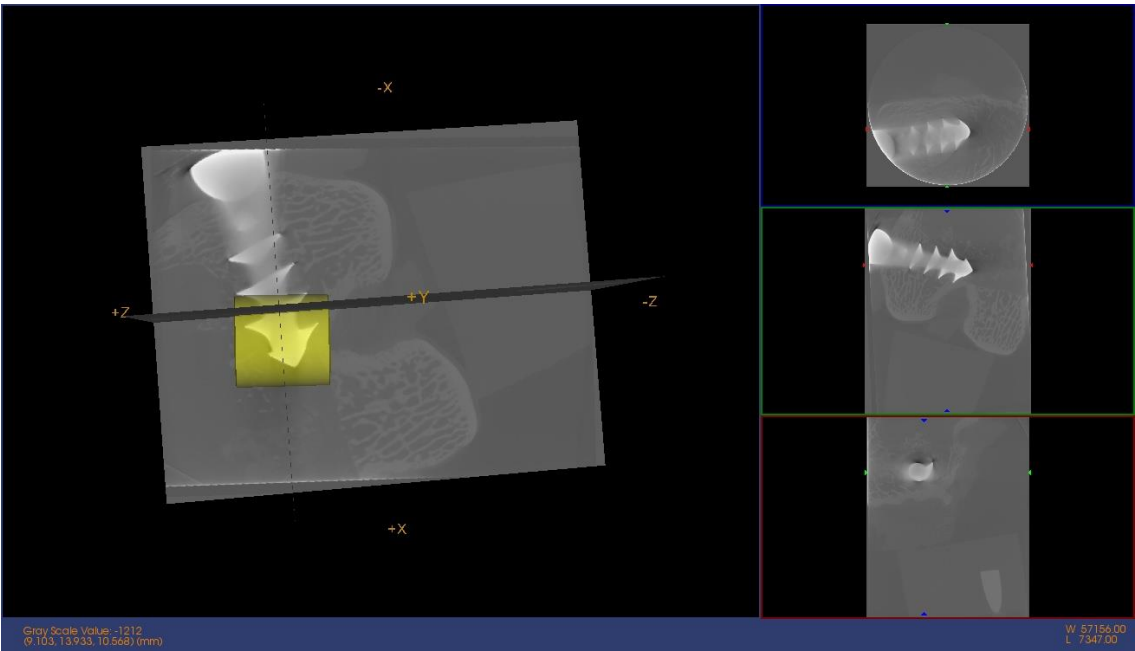


IMAGEN Micro CT

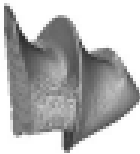


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 4388,0289	Std Dev: 7406,28
Volumen (mm^3): 96,8184	Volumen de Hueso (mm^3): 20,4718
Voxels: 2613000	BMC (mg) 30,6278
BMD (mg/cc): 316,3426	TMC (mg): 2,0972
TMD (mg/cc): 102,4427	BVF: 0,2114

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 48,76	Tb.Sp. 3D (pixels): 62,29
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,625521	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,79102

OHAp 48h (14)

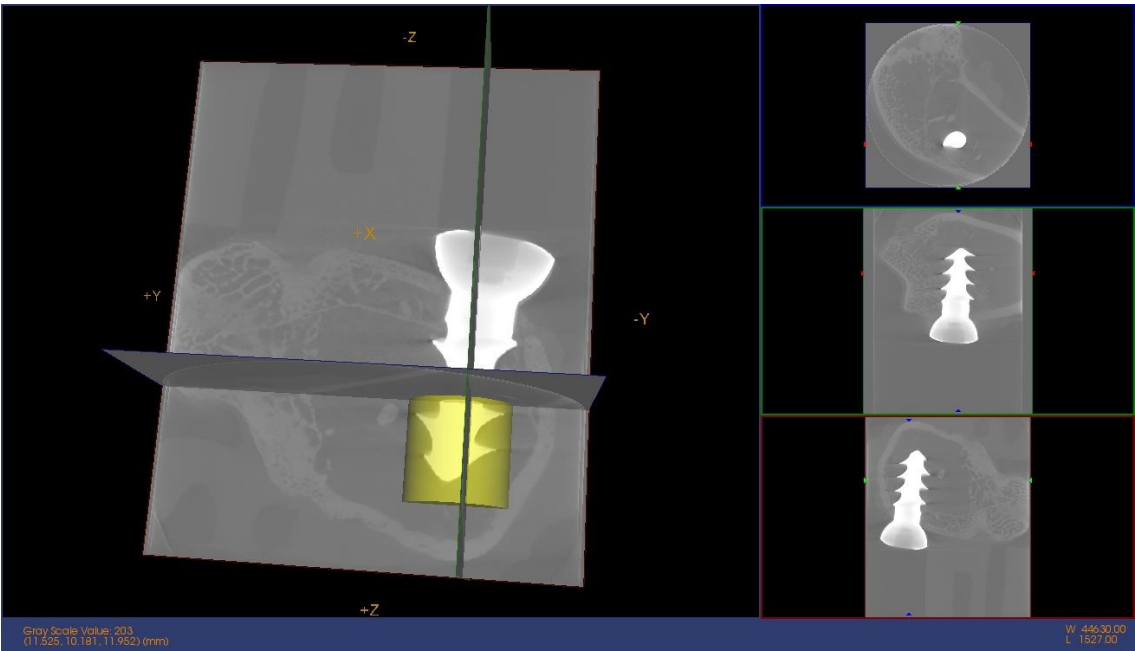


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 5686,9762	Std Dev: 10403
Volumen (mm^3): 97,5855	Volumen de Hueso (mm^3): 16,8985
Voxels: 2093340	BMC (mg) 18,1481
BMD (mg/cc): 185,9712	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF:0,1732

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 47,37	Tb.Sp. 3D (pixels): 57,48
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,704825	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,79312

OHAp 5 días (16)

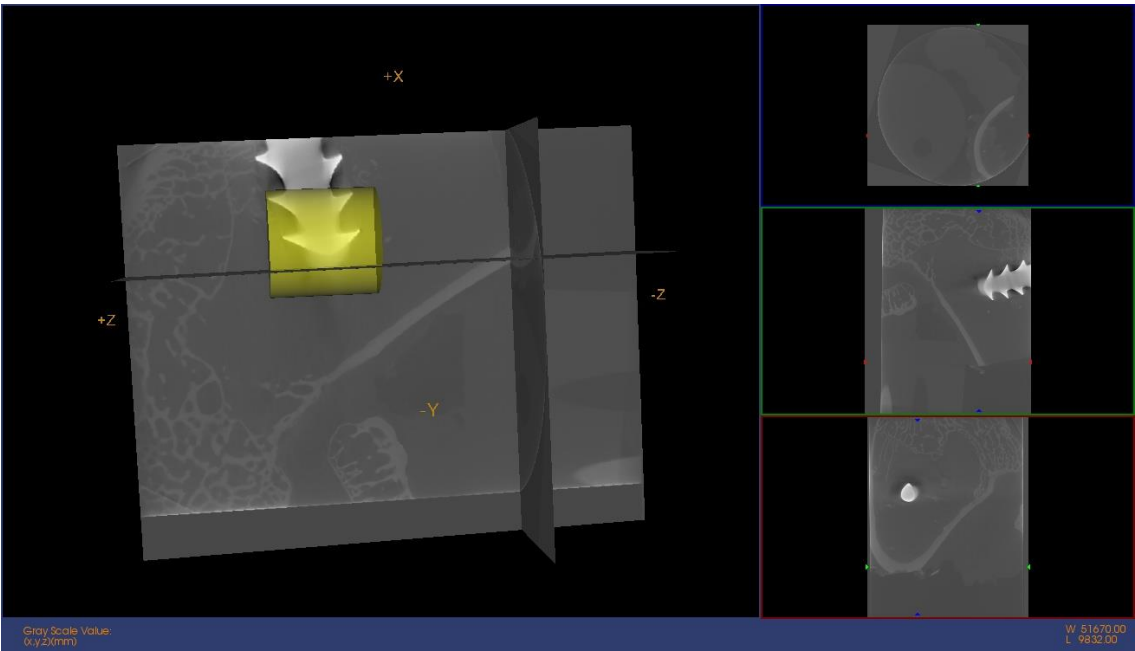


IMAGEN Micro CT

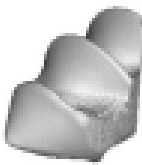


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 5141,1033	Std Dev: 8072,65
Volumen (mm^3): 96,2293	Volumen de Hueso (mm^3): 24,85
Voxels: 2597100	BMC (mg) 17,8293
BMD (mg/cc): 185,2797	TMC (mg): 1,451
TMD (mg/cc): 58,389	BVF: 0,2582

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 49,98	Tb.Sp. 3D (pixels): 63,28
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,66637	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,78903

OHAp 5 días (21)

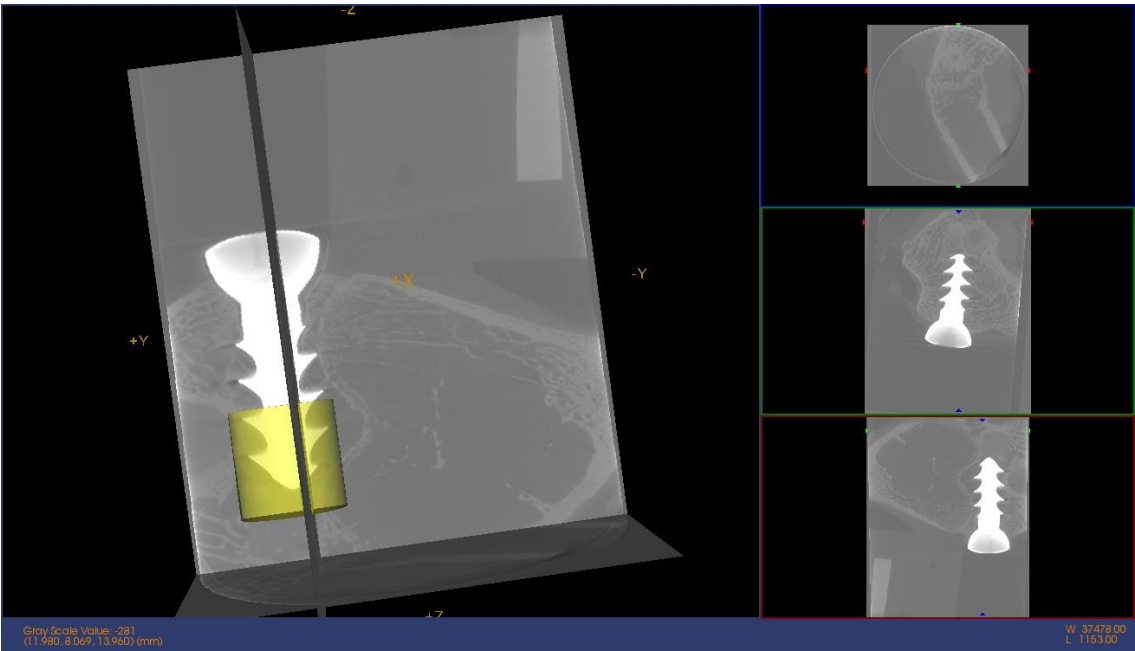


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media:6537,7631	Std Dev: 9893,43
Volumen (mm^3): 97,5631	Volumen de Hueso (mm^3): 16,8826
Voxels: 2092860	BMC (mg) 36,8126
BMD (mg/cc): 377,3208	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF:0,173

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 47,15	Tb.Sp. 3D (pixels): 50,08
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,69697	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,81977

OHAp-Fn 24h (24)

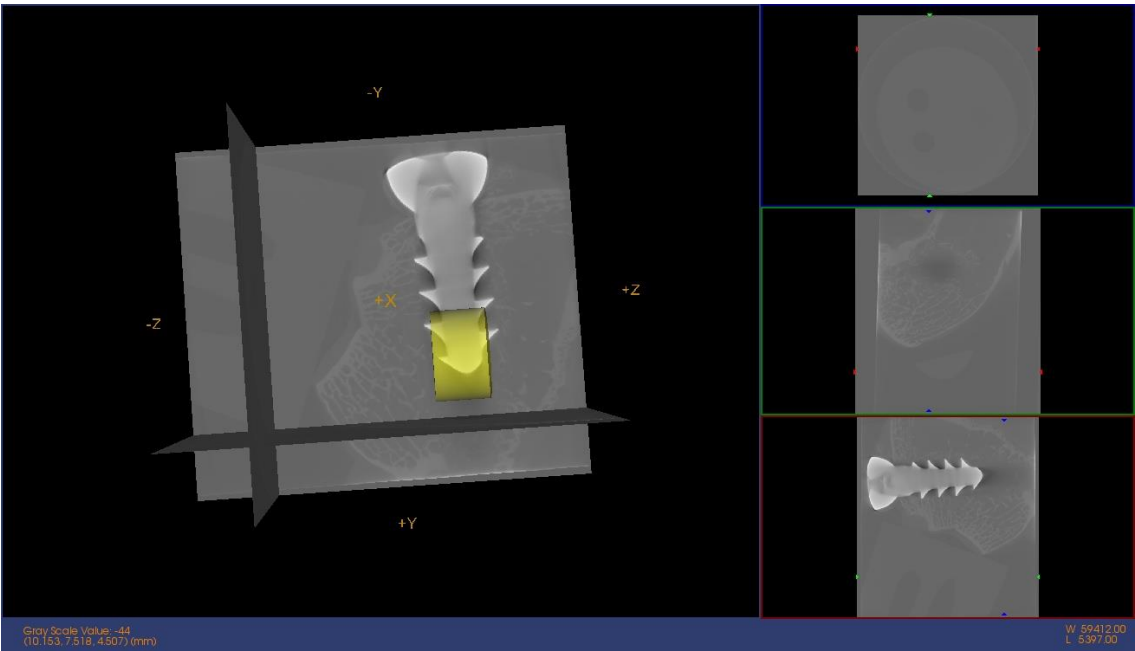


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 4057,5136	Std Dev: 6725,97
Volumen (mm^3): 57,7336	Volumen de Hueso (mm^3): 18,5138
Voxels: 1558260	BMC (mg) 26,6249
BMD (mg/cc): 461,1367	TMC (mg): 16,2579
TMD (mg/cc): 878,1471	BVF: 0,3207

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 51,51	Tb.Sp. 3D (pixels): 50,55
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,71744	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,83147

OHAp-Fn 24h (26)

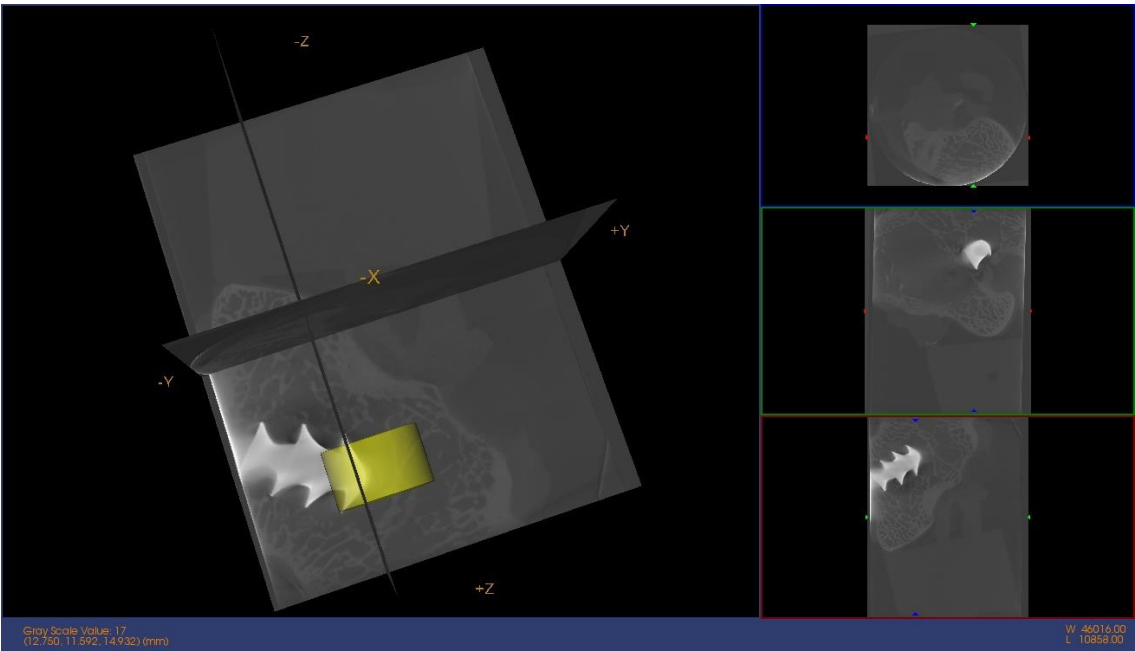


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media:4568,6418	Std Dev: 7699,67
Volumen (mm^3): 57,7376	Volumen de Hueso (mm^3): 9,9957
Voxels: 1558260	BMC (mg) 17,2257
BMD (mg/cc): 298,345	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF:0,173

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 47,99	Tb.Sp. 3D (pixels): 84,98
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,599737	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,71669

OHAp-Fn 24h (27)

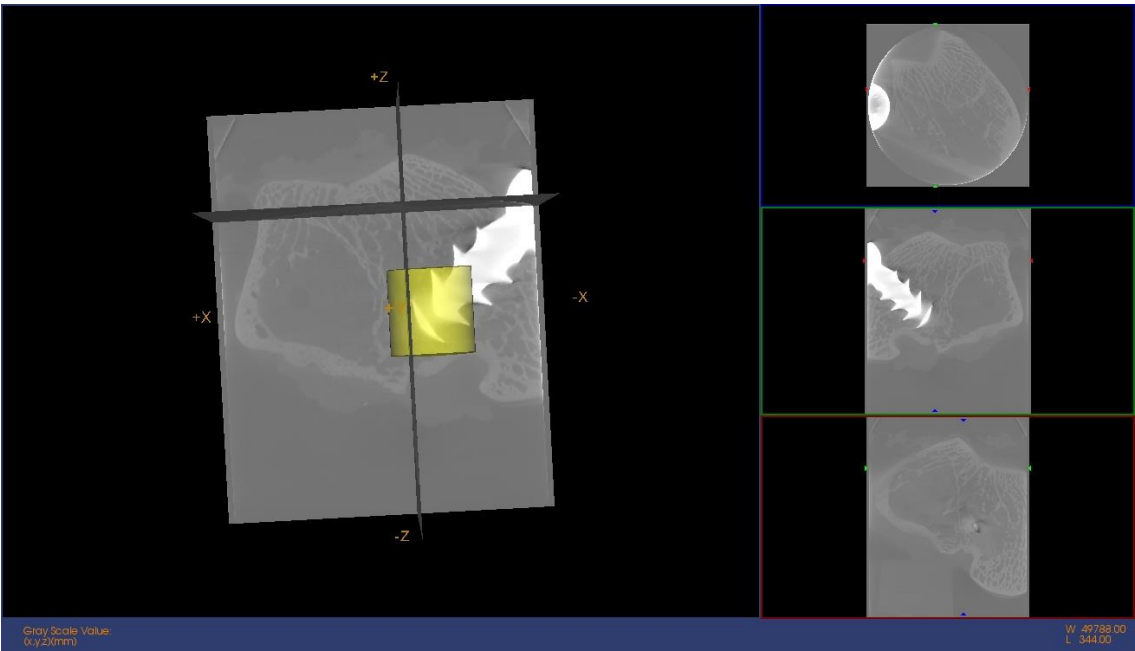


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 7141,2502	Std Dev: 10438
Volumen (mm^3): 96,2293	Volumen de Hueso (mm^3): 64,8879
Voxels: 2597100	BMC (mg) 27,0288
BMD (mg/cc): 280,8792	TMC (mg): 27,0239
TMD (mg/cc): 27,0239	BVF: 0,6743

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 56,43	Tb.Sp. 3D (pixels): 19,29
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,881417	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,9357

OHAp-Fn 48h (30)

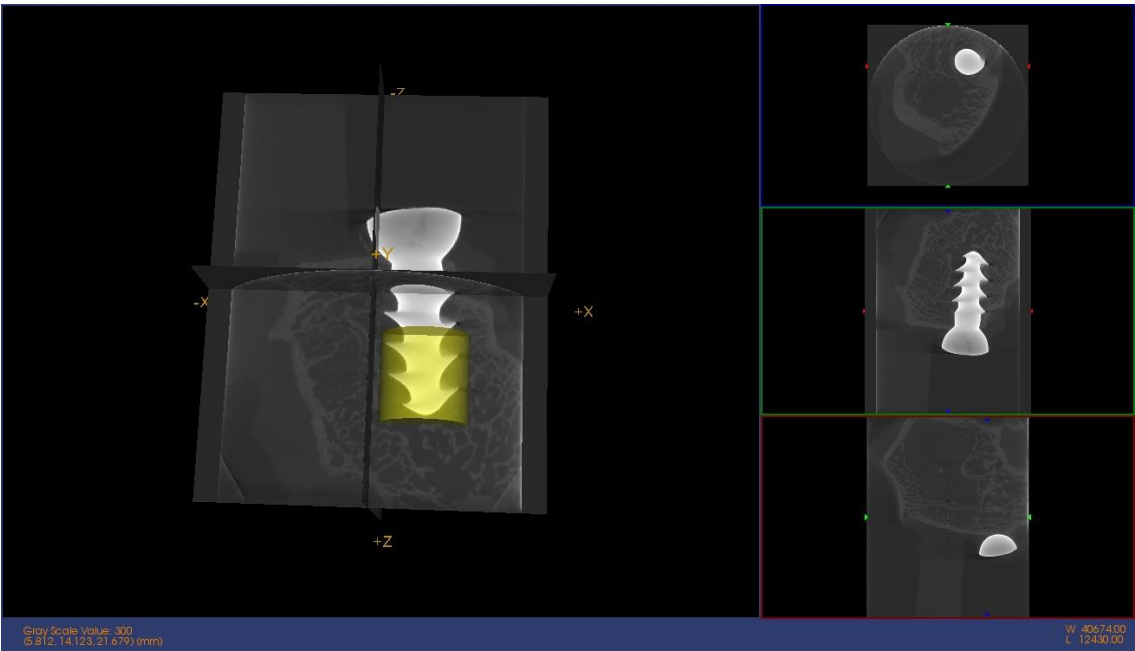


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 7411,9905	Std Dev: 10475,3
Volumen (mm^3): 95,5878	Volumen de Hueso (mm^3): 21,677
Voxels: 2579786	BMC (mg) 29,5569
BMD (mg/cc): 309,2127	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,2268

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 51,35	Tb.Sp. 3D (pixels): 42
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,71197	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,85999

OHAp-Fn 48h (31)

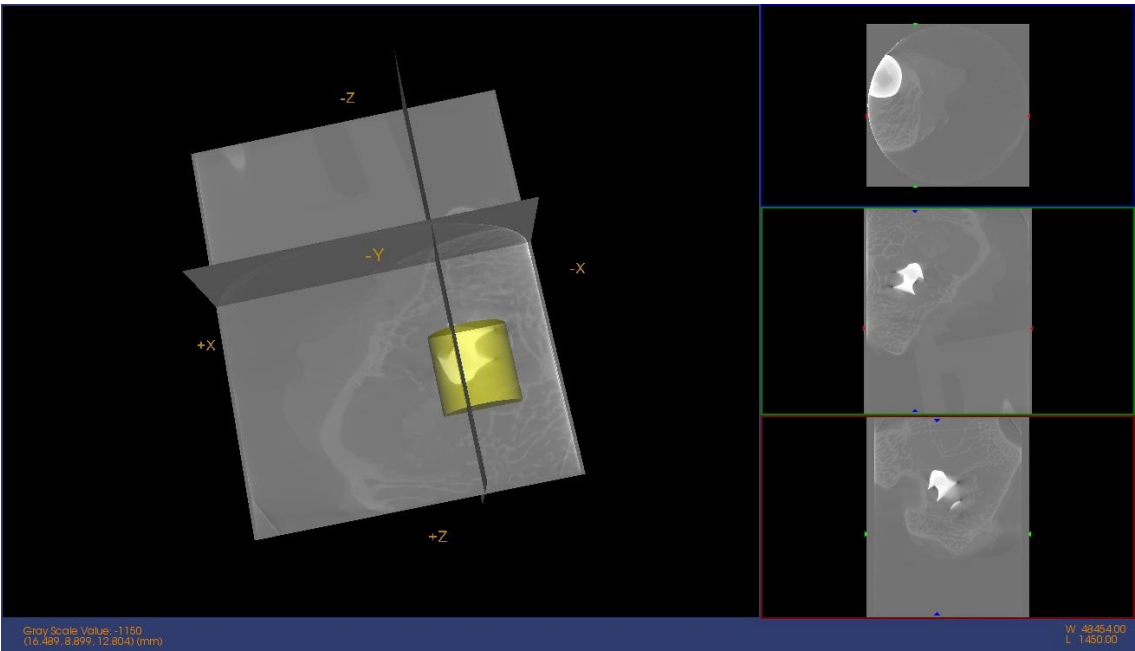


IMAGEN Micro CT

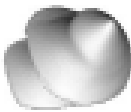


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 5452,7483	Std Dev: 8602,21
Volumen (mm^3): 98,2876	Volumen de Hueso (mm^3): 17,5244
Voxels: 2108400	BMC (mg)31,8254
BMD (mg/cc): 323,7993	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,178

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 49,4	Tb.Sp. 3D (pixels): 73,6
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,777794	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,7351

OHAp-Fn 48h (32)

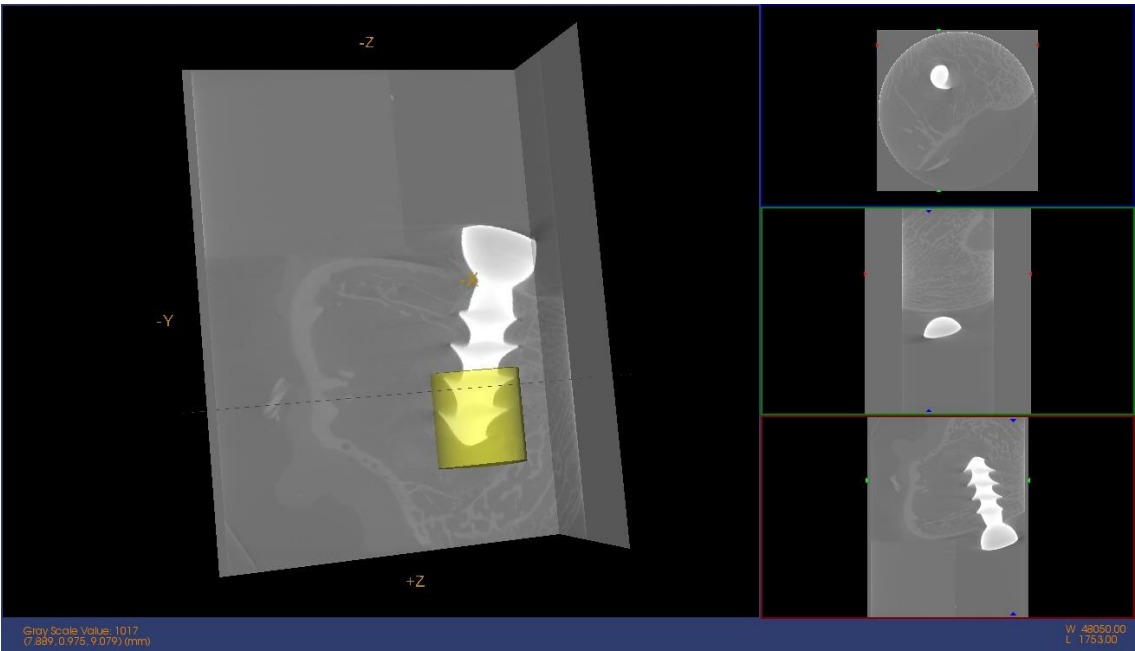


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 6408,047	Std Dev: 9680,36
Volumen (mm^3): 97,5631	Volumen de Hueso (mm^3): 20,2947
Voxels: 2092860	BMC (mg) 30,9261
BMD (mg/cc): 316,9855	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF:0,208

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 49,71	Tb.Sp. 3D (pixels): 49,82
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,788908	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,82072

OHAp-Fn 5 días (36)

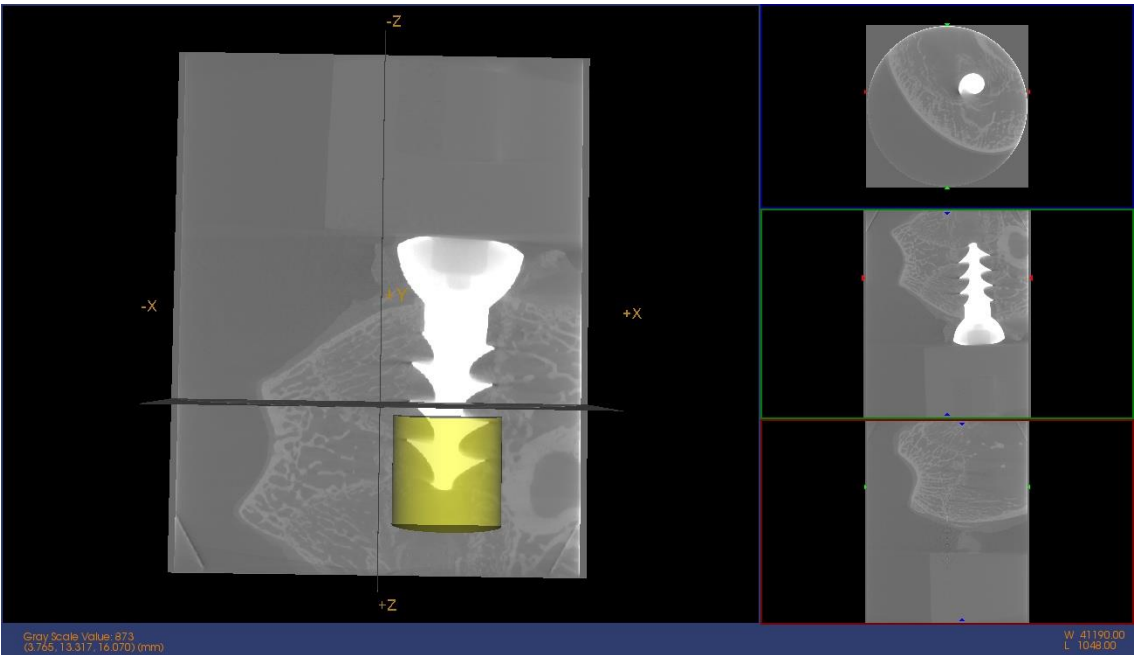


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 6367,6568	Std Dev: 11535,5
Volumen (mm^3): 96,173	Volumen de Hueso (mm^3): 16,2467
Voxels: 2595580	BMC (mg) 19,9691
BMD (mg/cc): 207,6379	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,1689

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 50,65	Tb.Sp. 3D (pixels): 63,65
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,68858	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,78782

OHAp-Fn 5 días (40)

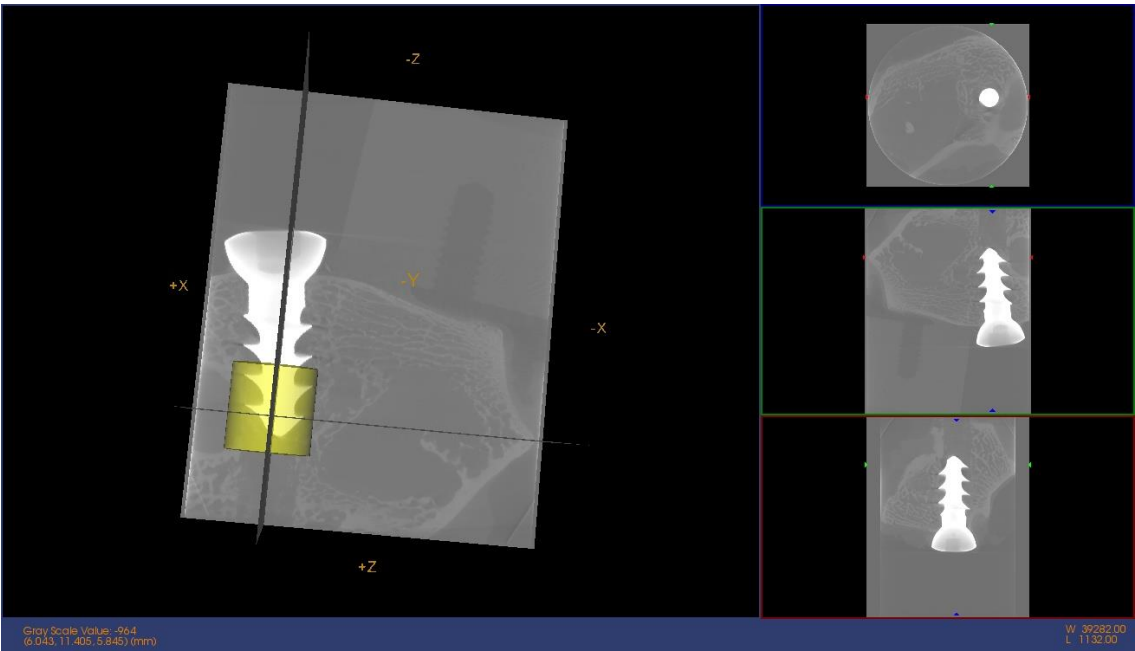


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 5939,6022	Std Dev: 9021,77
Volumen (mm^3): 98,2876	Volumen de Hueso (mm^3): 17,5165
Voxels: 2108400	BMC (mg) 38,476
BMD (mg/cc): 391,464	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,1782

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 48,45	Tb.Sp. 3D (pixels): 51,21
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,743888	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,81569

OHAp-Fn 5 días (41)

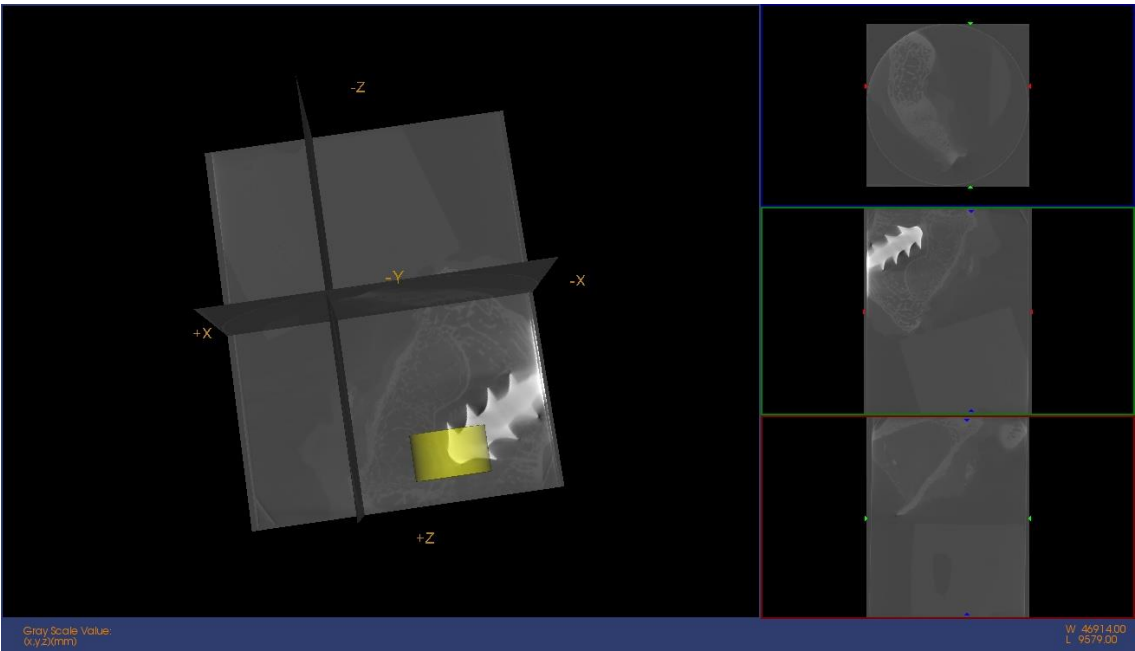


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 5494,5742	Std Dev: 8331,61
Volumen (mm^3): 58,5379	Volumen de Hueso (mm^3): 12,7219
Voxels: 1255716	BMC (mg) 16,5151
BMD (mg/cc): 282,1275	TMC (mg):
TMD (mg/cc):	BVF: 0,217

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 47,3	Tb.Sp. 3D (pixels): 61,34
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 1,702295	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,77920

Zona alejada del tornillo

Control 24h (10C)

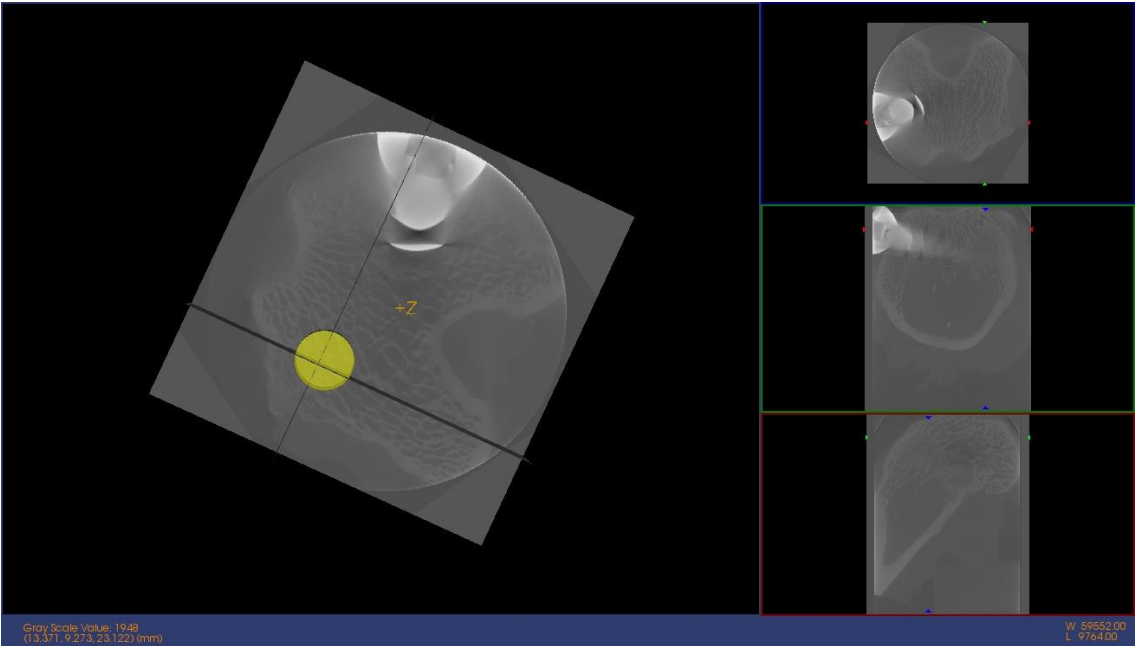


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 1290,7064	Std Dev: 983,676
Volumen (mm^3): 20,6087	Volumen de Hueso (mm^3): 8,4524
Voxels: 556200	BMC (mg) 4,7113
BMD (mg/cc): 228,6059	TMC (mg): 3,4919
TMD (mg/cc):	BVF:0,4101

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 11,47	Tb.Sp. 3D (pixels): 13,18
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,382254	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,9561

Control 24h (11C)

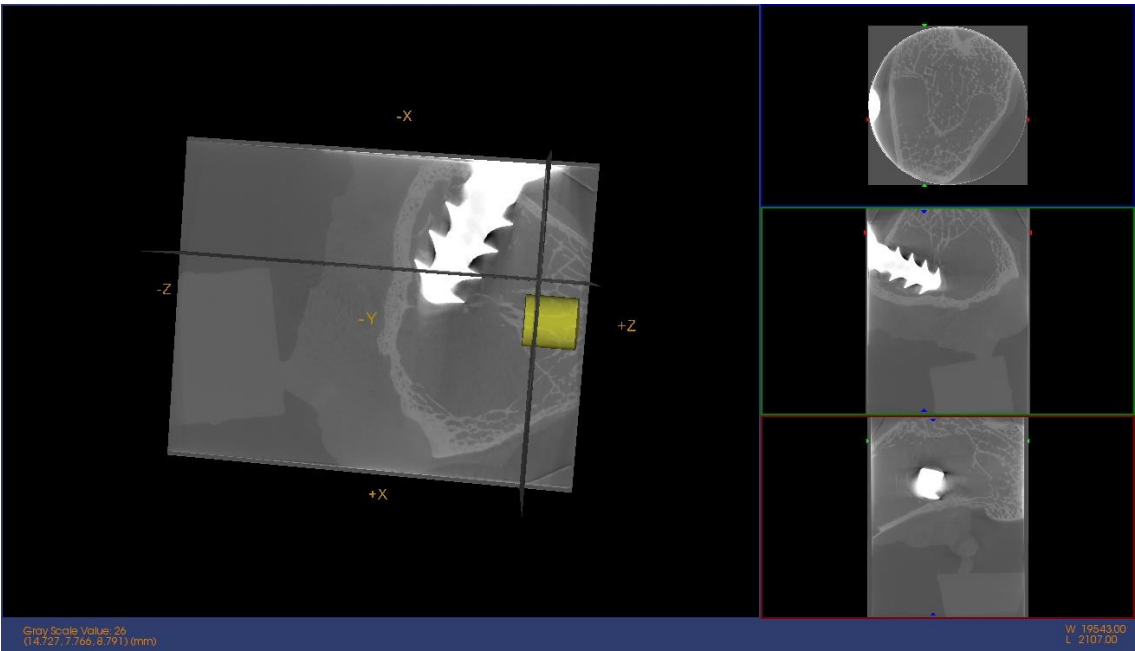


IMAGEN Micro CT

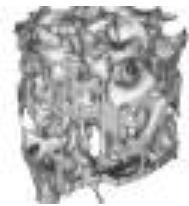


IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 262,6326	Std Dev: 572,057
Volumen (mm^3): 20,4819	Volumen de Hueso (mm^3): 4,2903
Voxels: 552780	BMC (mg) 1,7156
BMD (mg/cc): 83,7625	TMC (mg): 1,643
TMD (mg/cc): 382,9526	BVF: 0,2095

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 9,91	Tb.Sp. 3D (pixels):19,17
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,330459	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,93609

Control 24h (12C)

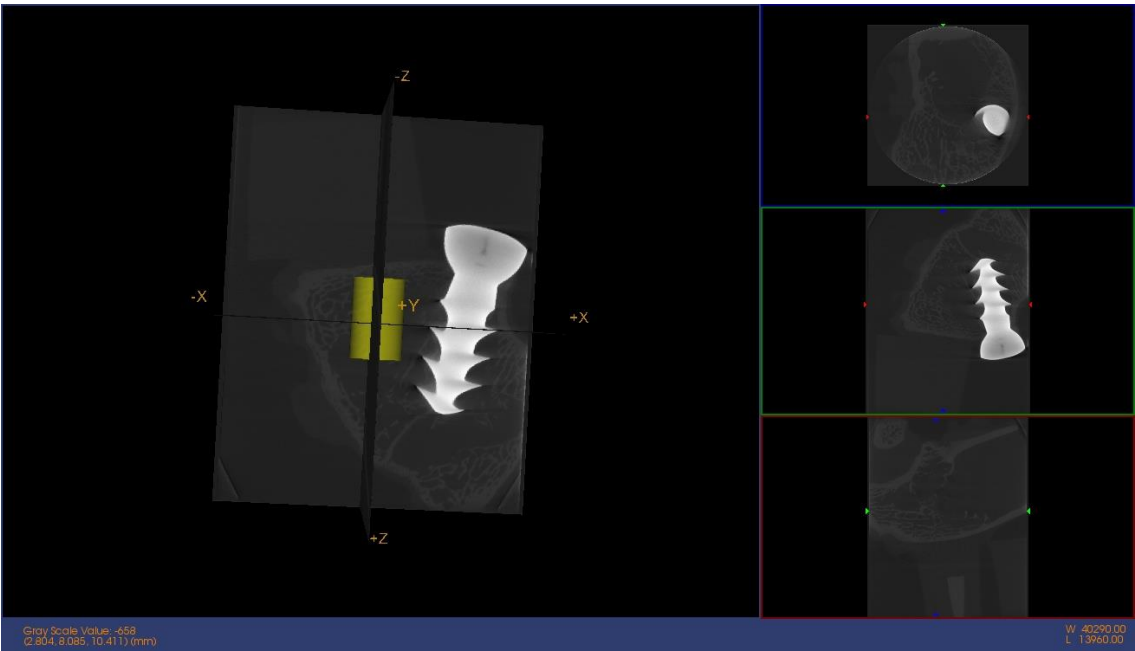


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 174,5218	Std Dev: 580,842
Volumen (mm^3):36,1725	Volumen de Hueso (mm^3): 9,1714
Voxels:976248	BMC (mg) 5,686
BMD (mg/cc): 157,1916	TMC (mg): 5,5365
TMD (mg/cc): 603,6751	BVF: 0,2535

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 9,04	Tb.Sp. 3D (pixels): 22,9
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,301308	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,92366

Control 48h (15C)

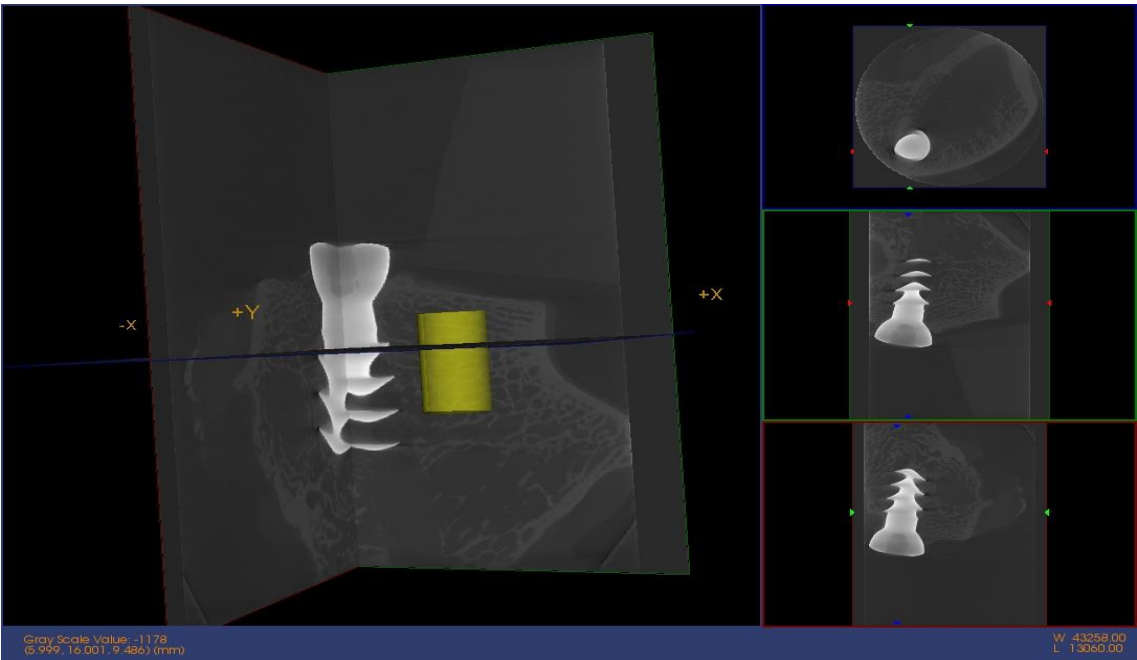


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 734,5551	Std Dev: 788,661
Volumen (mm^3): 34,7988	Volumen de Hueso (mm^3):11,0388
Voxels:746480	BMC (mg) 6,8007
BMD (mg/cc): 195,4294	TMC (mg): 5,0104
TMD (mg/cc):453,896	BVF:0,3172

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 8,6	Tb.Sp. 3D (pixels): 14,85
Calib. Tb.Th. 3D (mm):0,30937	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,94650

Control 5 días (2C)

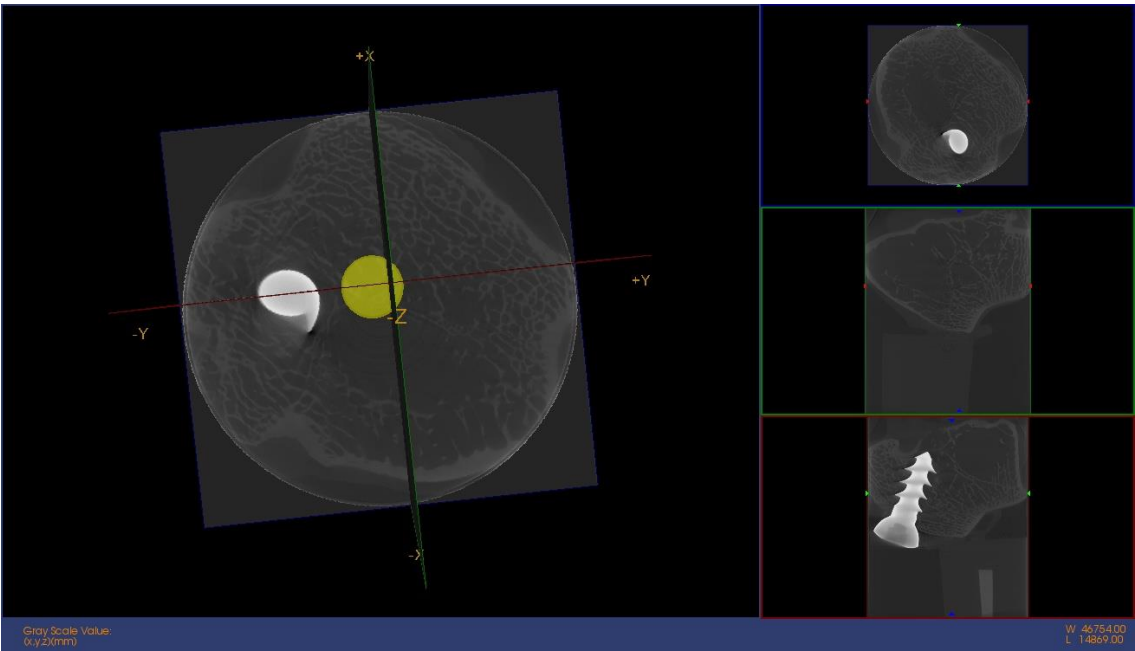


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 617,6549	Std Dev: 919,756
Volumen (mm^3):34,7988	Volumen de Hueso (mm^3): 10,3891
Voxels: 746480	BMC (mg) 5,5503
BMD (mg/cc):159,4979	TMC (mg): 4,3068
TMD (mg/cc): 414,5454	BVF: 0,2985

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels):	Tb.Sp. 3D (pixels): 14,43
Calib. Tb.Th. 3D (mm):	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,94806

OHAp 24h (1)

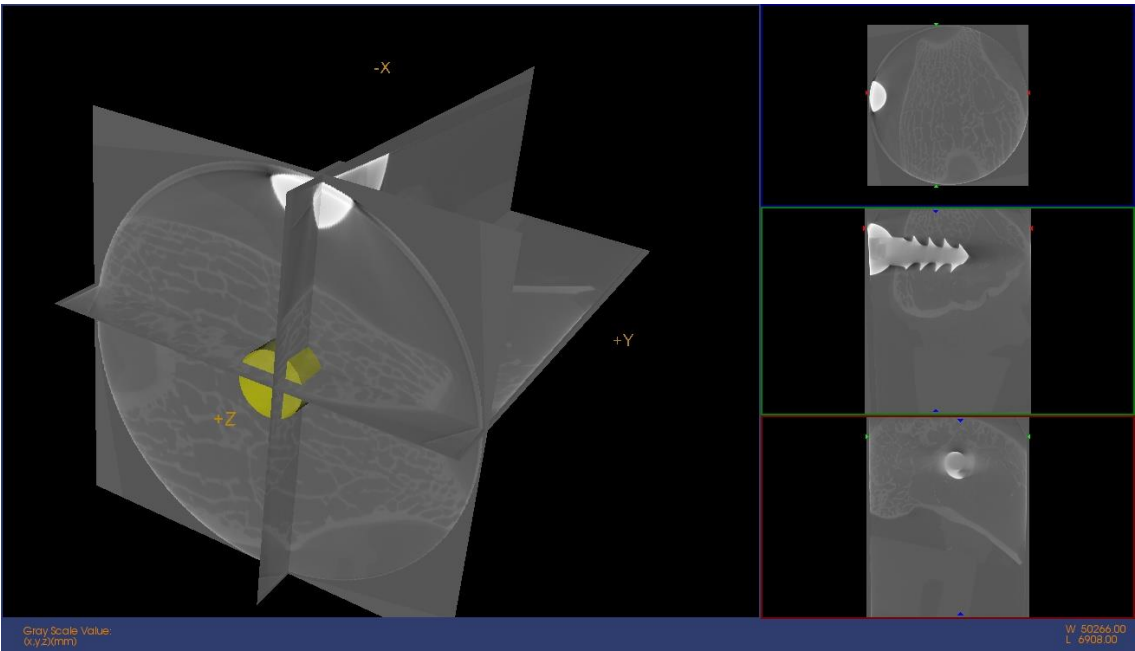


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 976,3813	Std Dev: 743,158
Volumen (mm^3): 13,427	Volumen de Hueso (mm^3): 3,864
Voxels: 362378	BMC (mg) 3,5652
BMD (mg/cc): 265,5245	TMC (mg): 2,1475
TMD (mg/cc): 555,7764	BVF: 0,2878

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels):	Tb.Sp. 3D (pixels): 15,44
Calib. Tb.Th. 3D (mm):	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,94852

OHAp 24h (6)

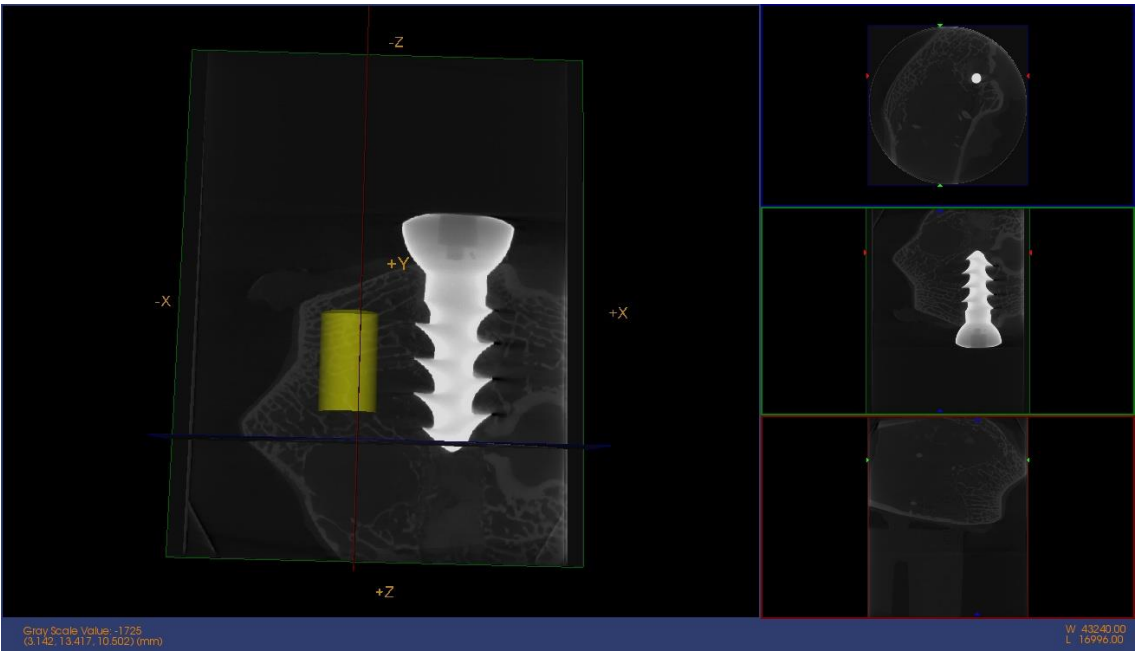


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 480,4586	Std Dev: 921,033
Volumen (mm^3): 34,5502	Volumen de Hueso (mm^3): 8,6469
Voxels: 741148	BMC (mg) 3,873
BMD (mg/cc): 112,0977	TMC (mg): 3,2756
TMD (mg/cc): 378,8167	BVF:0,2503

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 2,7	Tb.Sp. 3D (pixels): 14,02
Calib. Tb.Th. 3D (mm):0,097041	Calib. Tb.Sp. 3D (mm):0,9496

OHAp 48h (10)

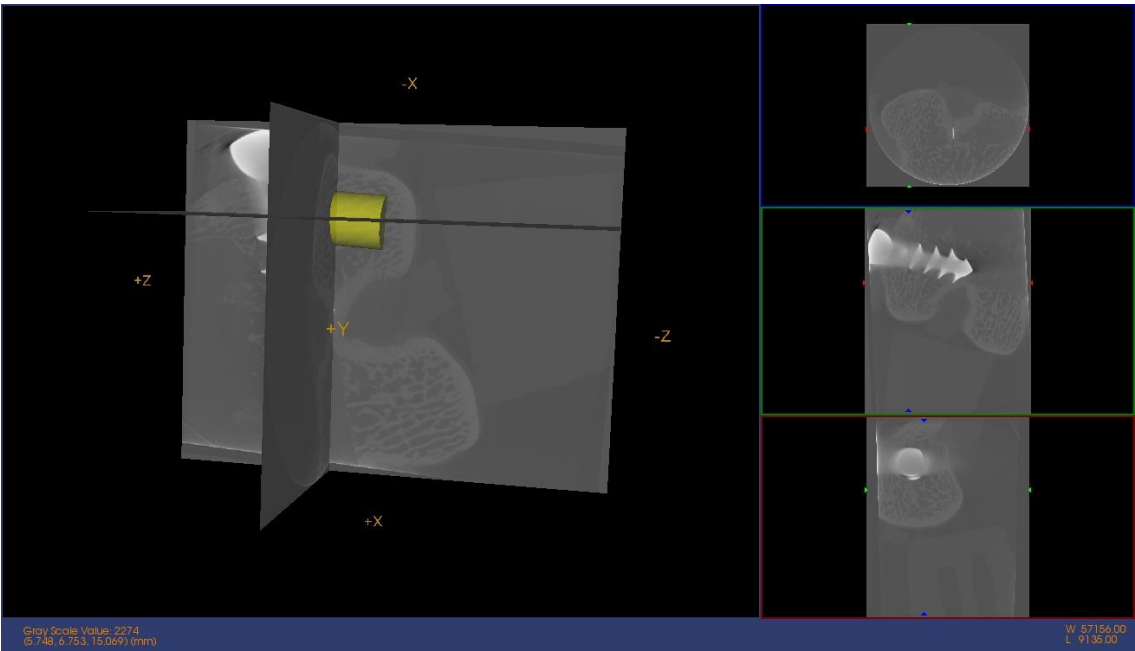


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media:1456,072	Std Dev: 935,711
Volumen (mm^3): 20,2544	Volumen de Hueso (mm^3): 8,2131
Voxels: 546638	BMC (mg) 7,8045
BMD (mg/cc): 385,3246	TMC (mg): 5,4541
TMD (mg/cc): 664,0799	BVF:0,4055

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 9,32	Tb.Sp. 3D (pixels): 11,82
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,310786	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,96059

OHAp 48h (14)

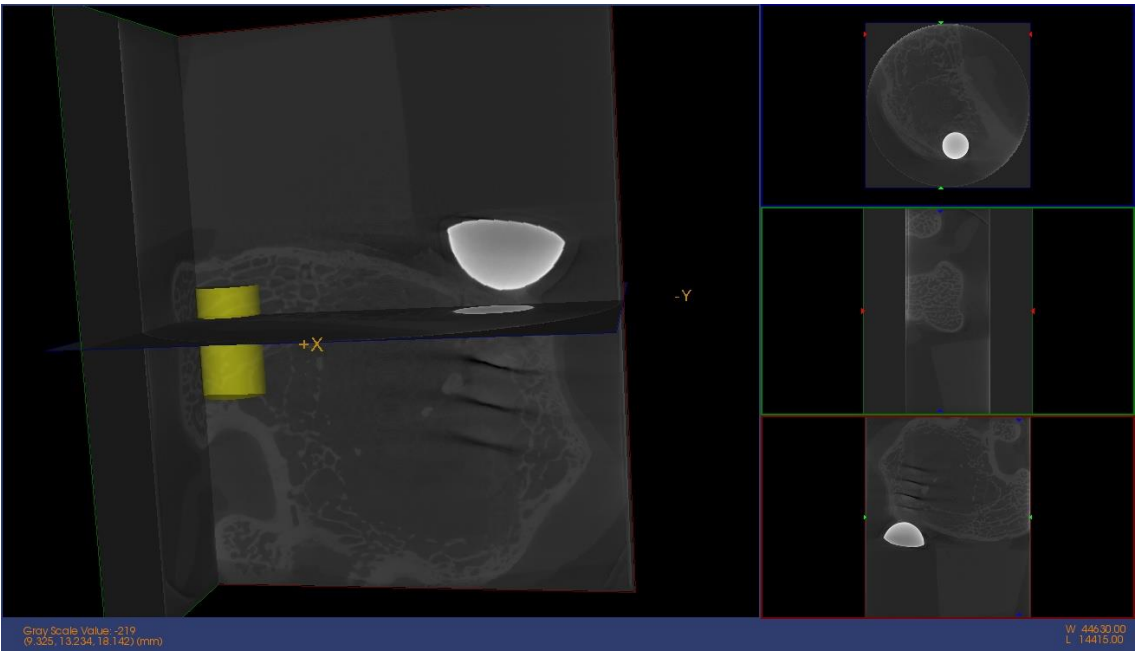


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 1223,1161	Std Dev: 880,741
Volumen (mm^3): 34,9131	Volumen de Hueso (mm^3): 11,0881
Voxels: 748932	BMC (mg) 9,7521
BMD (mg/cc): 279,3247	TMC (mg): 5,9813
TMD (mg/cc): 539,4392	BVF:0,3176

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 8,99	Tb.Sp. 3D (pixels): 18,27
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,323659	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,93424

OHAp 5 días (16)

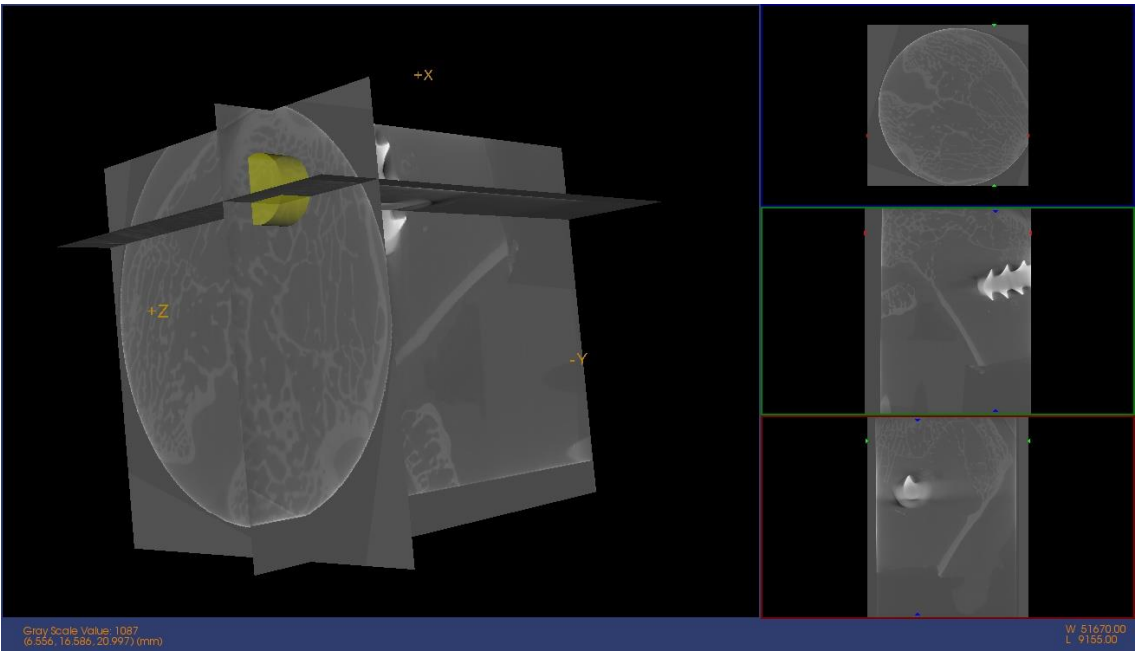


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 1162,3906	Std Dev: 944,224
Volumen (mm^3): 20,2544	Volumen de Hueso (mm^3): 5,6953
Voxels: 546638	BMC (mg) 4,2964
BMD (mg/cc): 212,1209	TMC (mg): 2,6258
TMD (mg/cc): 461,0463	BVF:0,2812

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 12,41	Tb.Sp. 3D (pixels):20,15
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,413775	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,93284

OHAp 5 días (21)

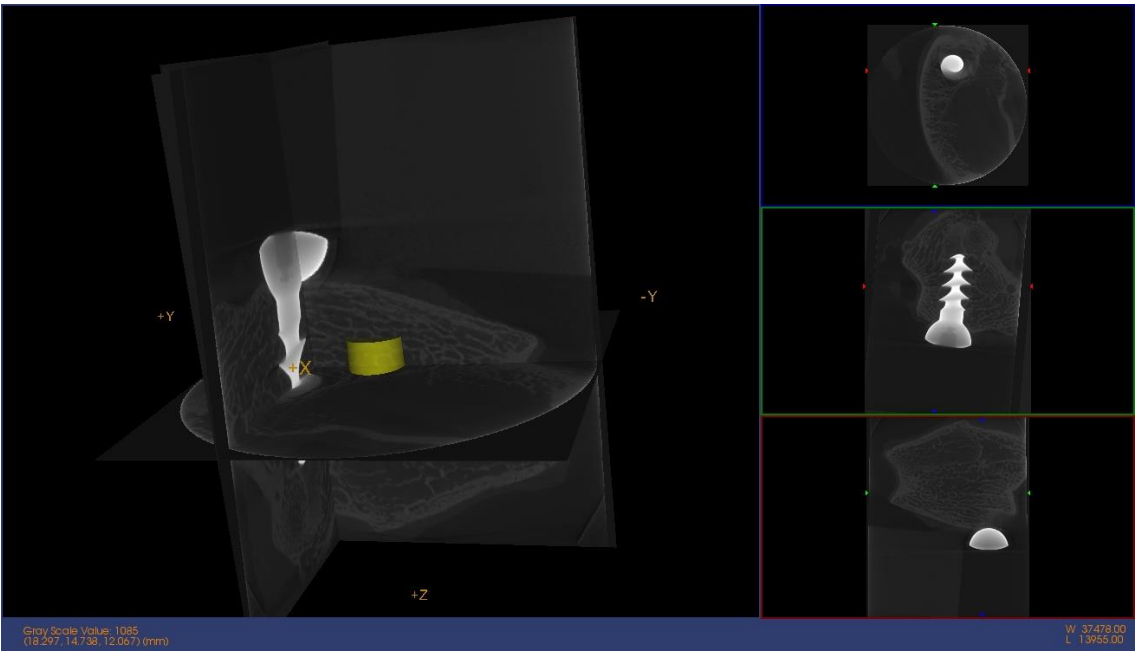


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 760,3446	Std Dev: 766,327
Volumen (mm^3):34,5502	Volumen de Hueso (mm^3): 8,5536
Voxels: 741148	BMC (mg) 6,135
BMD (mg/cc): 177,5663	TMC (mg): 3,8424
TMD (mg/cc): 449,2183	BVF:0,2476

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 9,29	Tb.Sp. 3D (pixels):18,5
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,334522	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,93342

OHAp-Fn 24h (24)

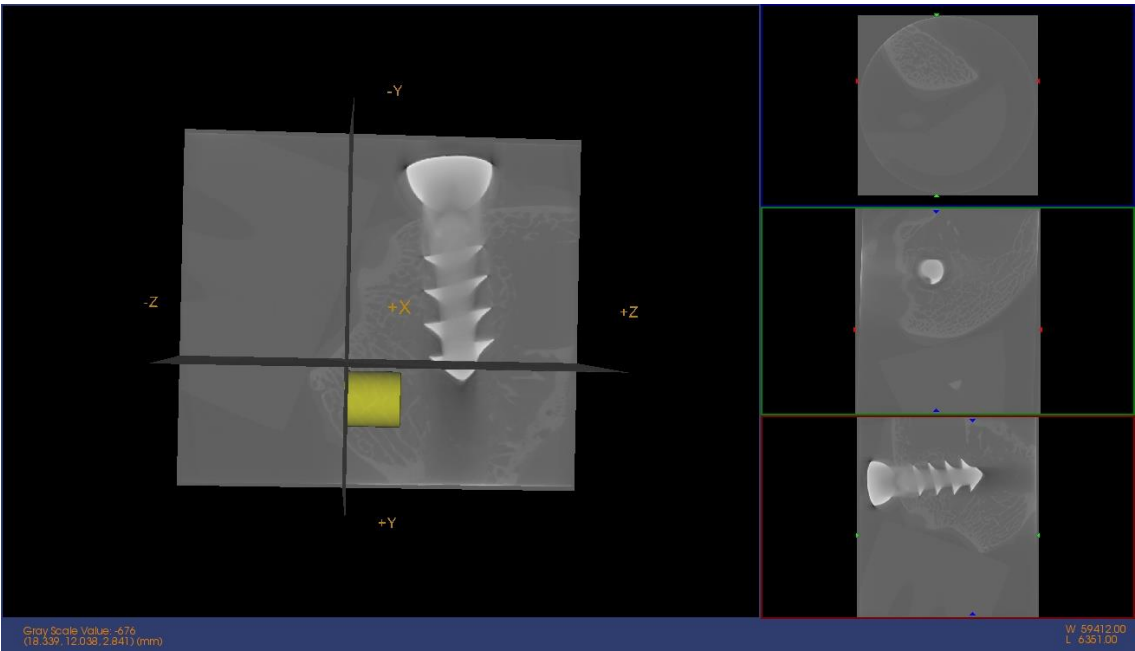


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 871,1624	Std Dev: 732,075
Volumen (mm^3):20,6087	Volumen de Hueso (mm^3): 5,3325
Voxels: 556200	BMC (mg) 5,1401
BMD (mg/cc): 249,4122	TMC (mg): 3,0555
TMD (mg/cc): 572,9962	BVF: 0,2568

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels):	Tb.Sp. 3D (pixels): 15,65
Calib. Tb.Th. 3D (mm):	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,94783

OHAp-Fn 24h (26)

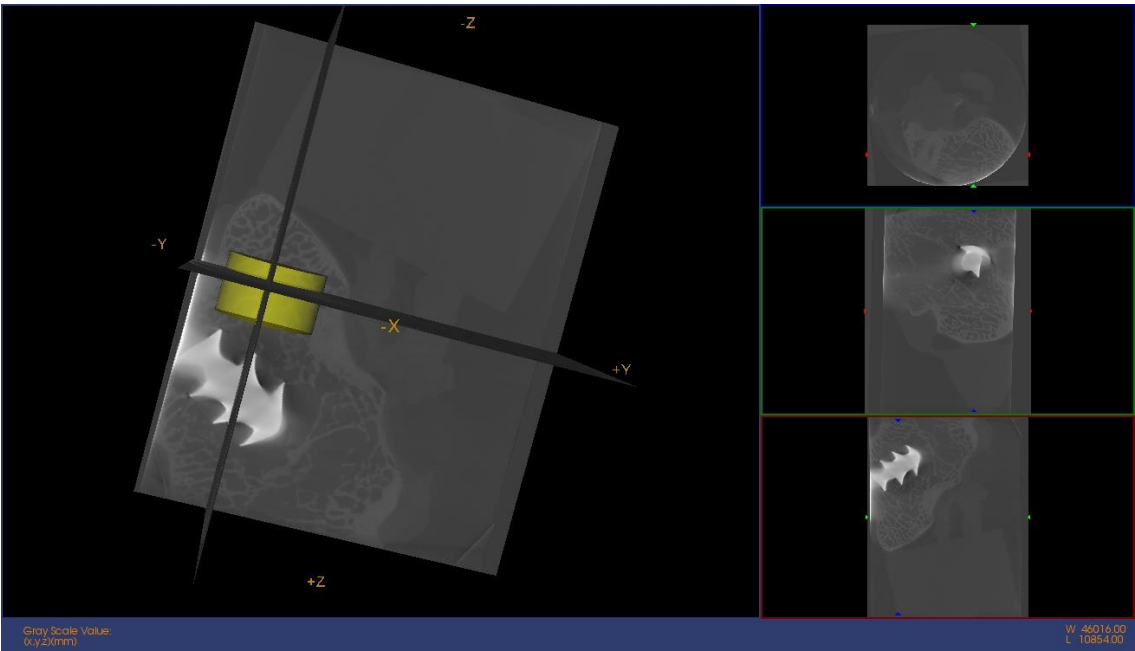


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 1863,0933	Std Dev: 970,863
Volumen (mm^3): 58,0911	Volumen de Hueso (mm^3): 22,5026
Voxels: 1567800	BMC (mg) 30,1357
BMD (mg/cc): 518,7663	TMC (mg): 18,2243
TMD (mg/cc): 809,8772	BVF: 0,3874

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 14,77	Tb.Sp. 3D (pixels): 18,91
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,492549	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,93695

OHAp-Fn 24h (27)

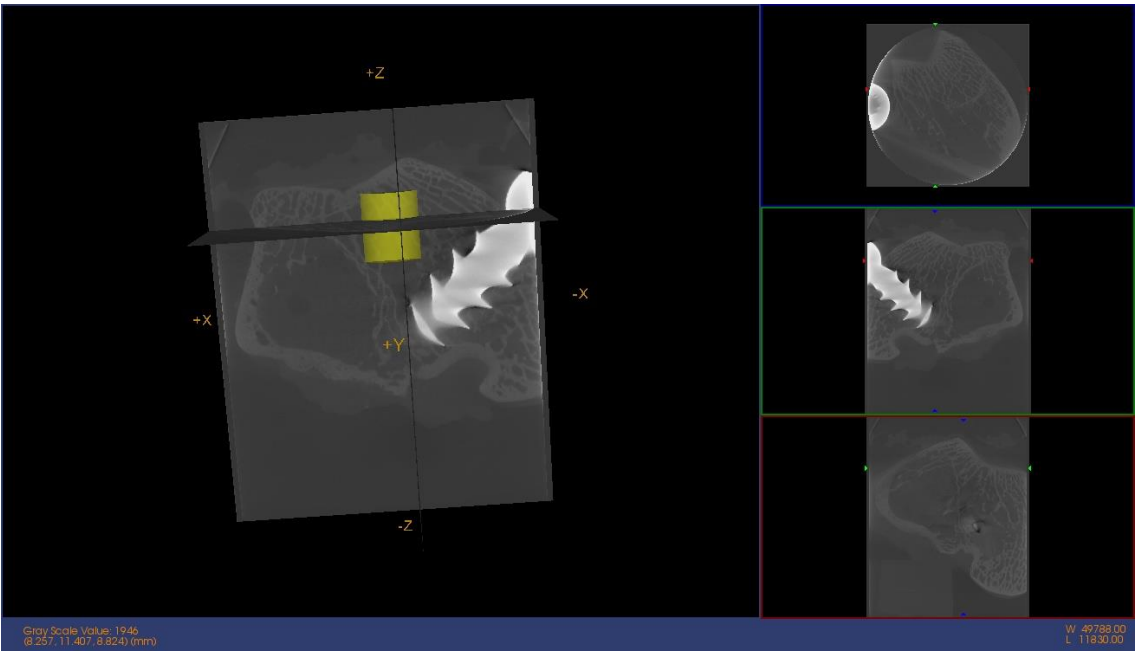


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 42,8598	Std Dev: 905,875
Volumen (mm^3):48,59	Volumen de Hueso (mm^3): 13,3013
Voxels: 1311380	BMC (mg) 4,0041
BMD (mg/cc): 82,4062	TMC (mg): 4,1372
TMD (mg/cc): 311,0409	BVF: 0,2737

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 9,57	Tb.Sp. 3D (pixels): 20,09
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,319102	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,93303

OHAp-Fn 48h (30)

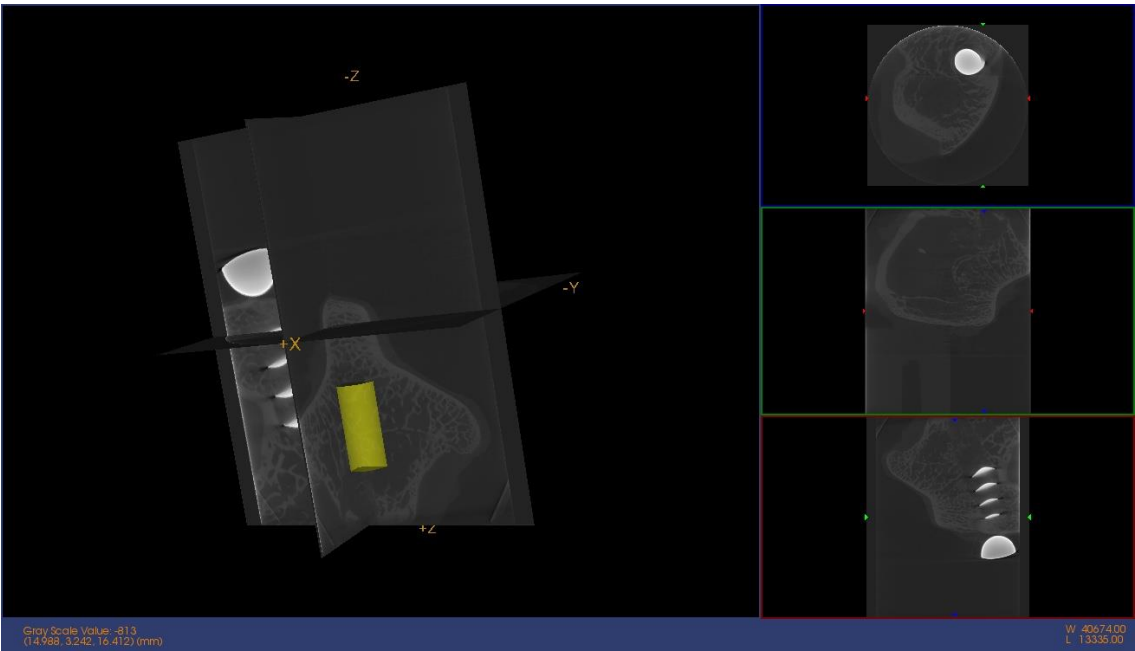


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 696,9715	Std Dev:692,168
Volumen (mm^3):34,1366	Volumen de Hueso (mm^3): 8,6566
Voxels: 921300	BMC (mg) 5,4253
BMD (mg/cc): 158,9298	TMC (mg): 3,3747
TMD (mg/cc): 389,8383	BVF:0,2536

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 9,98	Tb.Sp. 3D (pixels):17,08
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,332852	Calib. Tb.Sp. 3D (mm):0,94305

OHAp-Fn 48h (31)

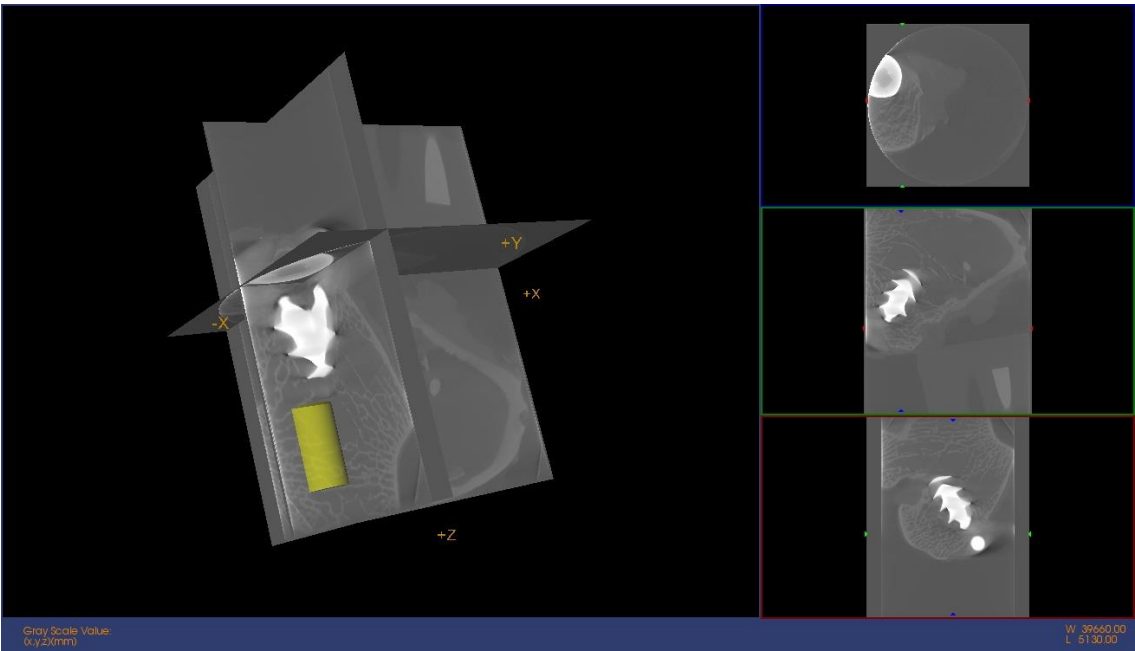


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 929,5499	Std Dev:779,183
Volumen (mm^3): 34,9131	Volumen de Hueso (mm^3): 7,1081
Voxels:748932	BMC (mg) 8,5534
BMD (mg/cc): 244,9901	TMC (mg): 4,3659
TMD (mg/cc): 614,2165	BVF:0,2036

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 9,15	Tb.Sp. 3D (pixels): 35,54
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,329475	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,87209

OHAp-Fn 48h (32)

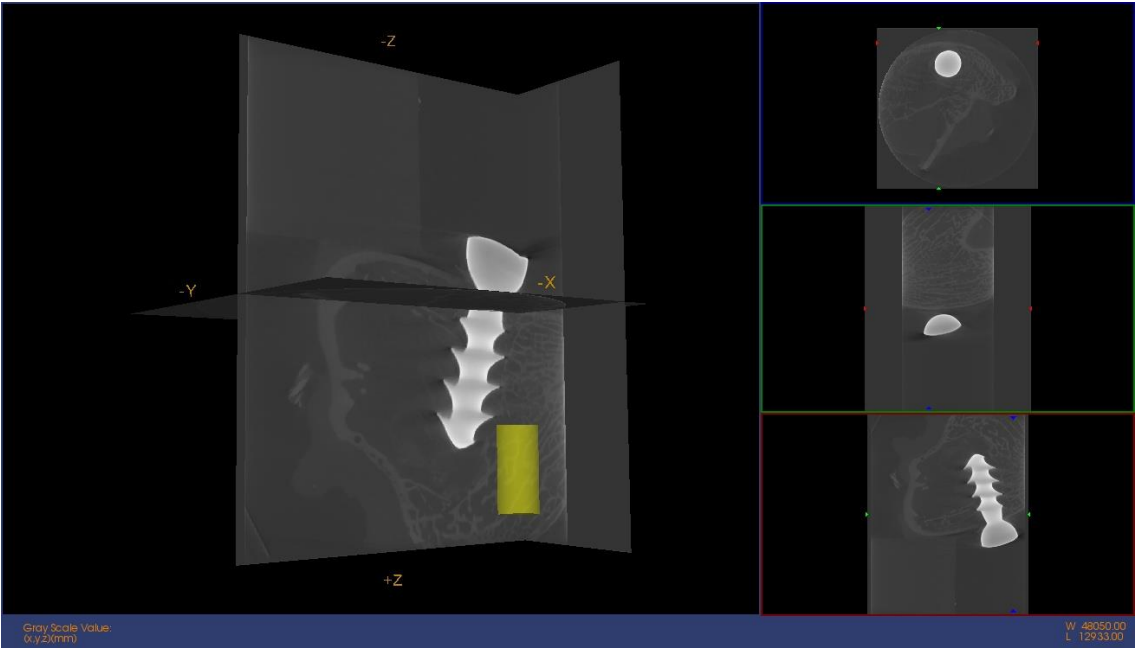


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 1437,9834	Std Dev: 906,009
Volumen (mm^3): 34,5502	Volumen de Hueso (mm^3): 10,9852
Voxels: 741148	BMC (mg):12,8644
BMD (mg/cc): 372,3382	TMC (mg):7,4531
TMD (mg/cc): 678,463	BVF: 0,3179

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 9,36	Tb.Sp. 3D (pixels): 15,76
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,336773	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,9433

OHAp-Fn 5 días (36)

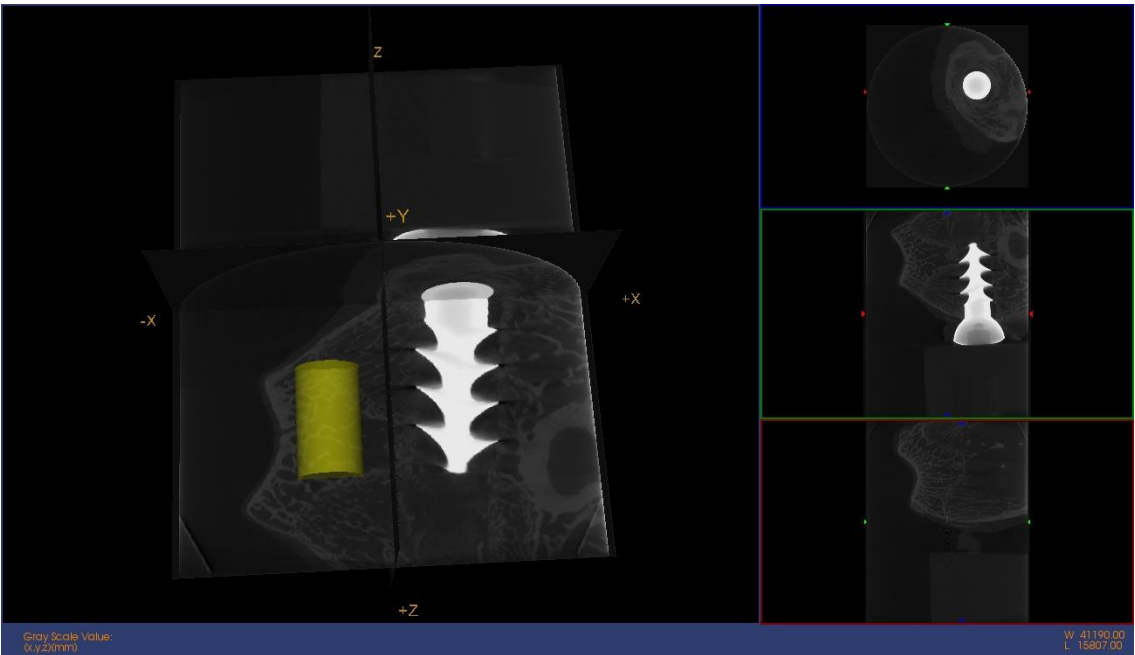


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 709,4816	Std Dev: 1100,35
Volumen (mm^3): 33,5501	Volumen de Hueso (mm^3): 11,2697
Voxels:905473	BMC (mg) 5,8799
BMD (mg/cc): 175,257	TMC (mg): 5,1943
TMD (mg/cc): 460,9068	BVF:0,3359
Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 10,27	Tb.Sp. 3D (pixels): 15,73
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,342545	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,94758

OHAp-Fn 5días (40)

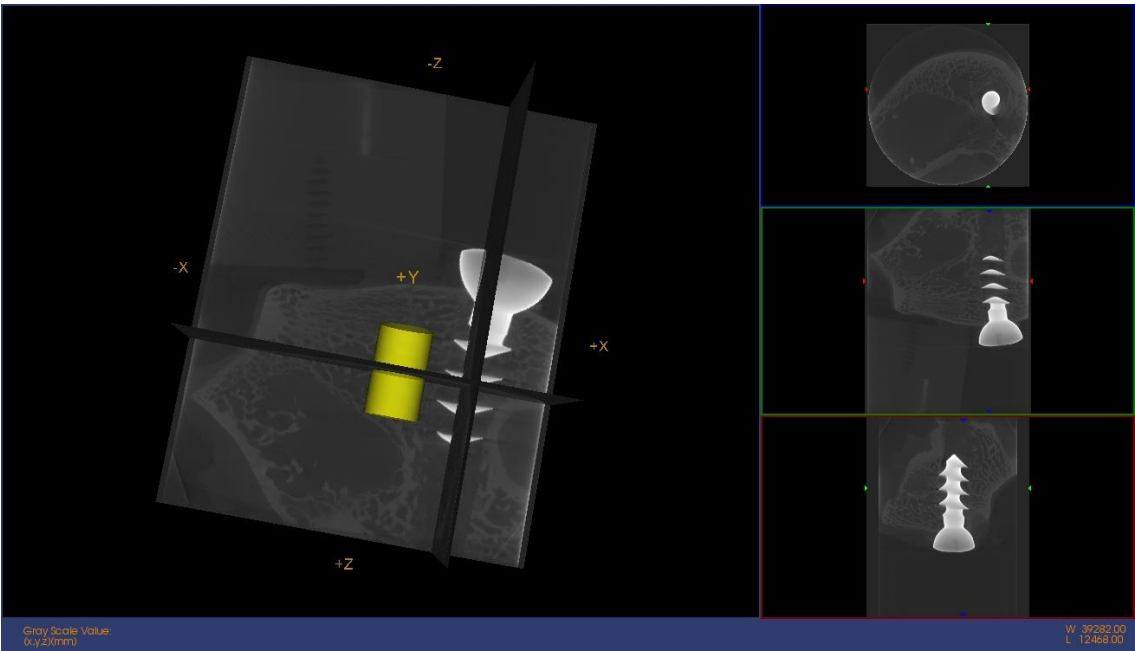


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media: 877,7095	Std Dev:808,98
Volumen (mm^3): 34,5502	Volumen de Hueso (mm^3): 11,4611
Voxels: 741148	BMC (mg)8,279
BMD (mg/cc):239,6227	TMC (mg): 5,8927
TMD (mg/cc): 514,1457	BVF: 0,3317

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 11,22	Tb.Sp. 3D (pixels): 19,64
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,403815	Calib. Tb.Sp. 3D (mm):0,92933

OHAp-Fn 5 días (41)

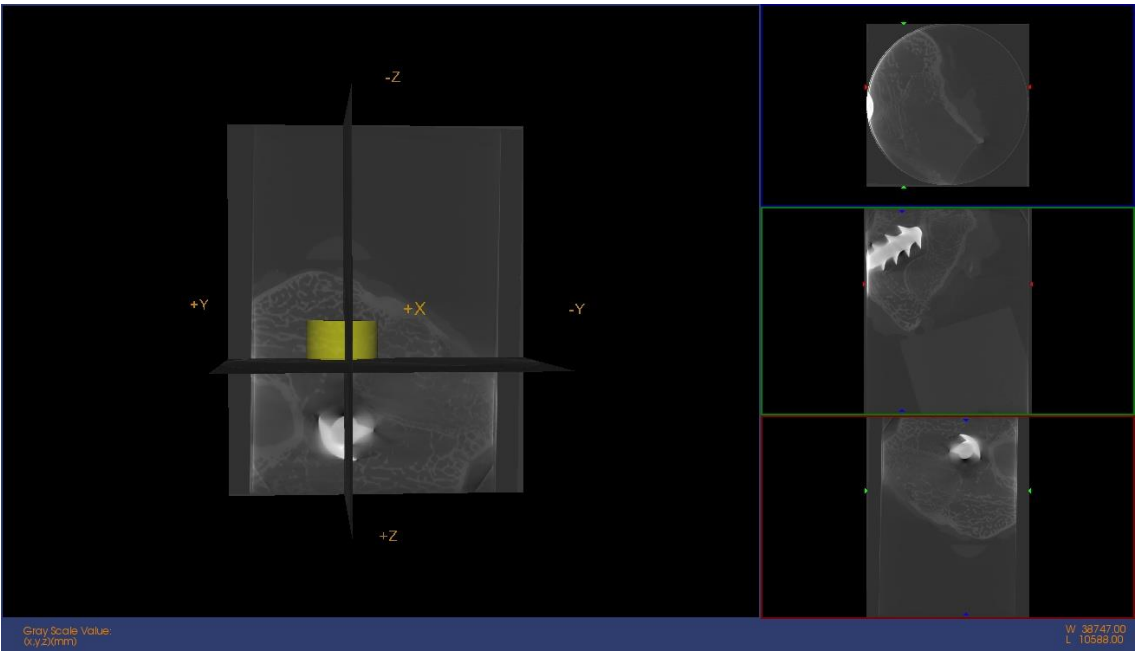


IMAGEN Micro CT



IMAGEN 3D

BMD Resultados	
Media:1470,9578	Std Dev: 922,23
Volumen (mm^3): 58,5379	Volumen de Hueso (mm^3): 21,8844
Voxels: 1255716	BMC (mg) 22,8382
BMD (mg/cc): 390,1435	TMC (mg): 12,3984
TMD (mg/cc): 657,9285	BVF:0,3739

Medidas Directas Resultados	
Tb.Th. 3D (pixels): 16,15	Tb.Sp. 3D (pixels): 17,81
Calib. Tb.Th. 3D (mm): 0,581415	Calib. Tb.Sp. 3D (mm): 0,93589

RESULTADOS HISTOLOGÍA.

A continuación mostramos los resultados completos del análisis de las muestras mediante radiología, imagen lupa y microscopio, de los distintos grupos.

Grupo Control

Control 7 (24h)

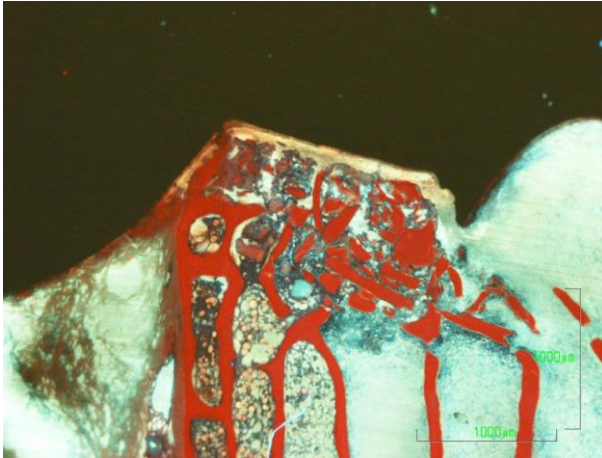
Rx e imagen lupa.

En la zona cercana a la cortical encontramos mayor celularidad y tejido conectivo, que puede provenir del periostio.

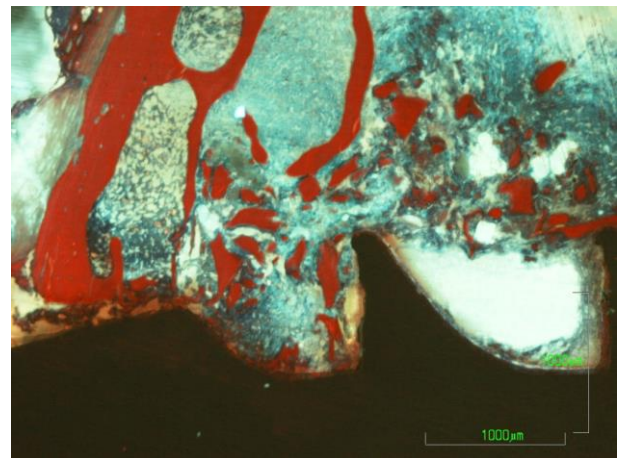
En la zona más interna encontramos tejido conectivo.

Médula ósea hematopoyética (MOH)

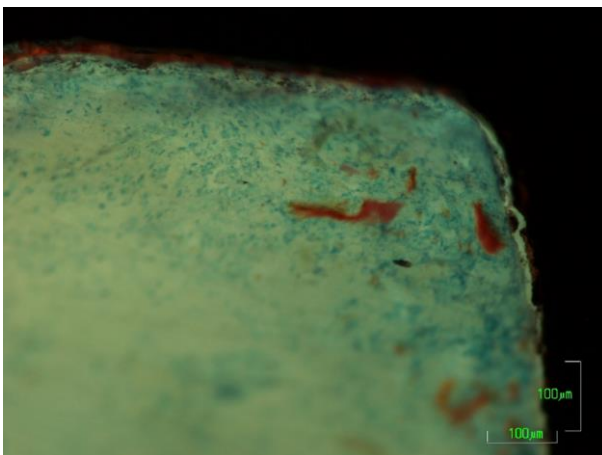




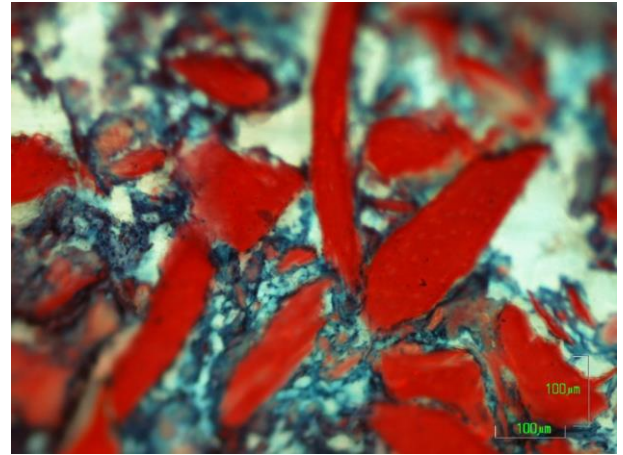
(2x) Panorámica de la zona superior, cortical, con numerosas esquirlas de hueso.



(2x) Panorámica del otro lateral del tornillo, de la zona cortical. Hay menos esquirlas óseas rodeadas de tejido conectivo.



(10x) Numerosas esquirlas de hueso, sobre todo en la zona más cercana a la cortical, compactadas, rodeadas de tejido conectivo.



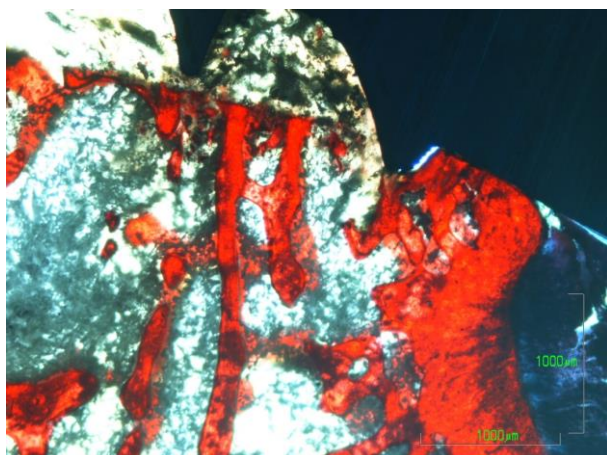
(10x) Desarrollo de tejido conectivo sobre la superficie del defecto, en la zona más interna.

CONTROL 14 (48H)

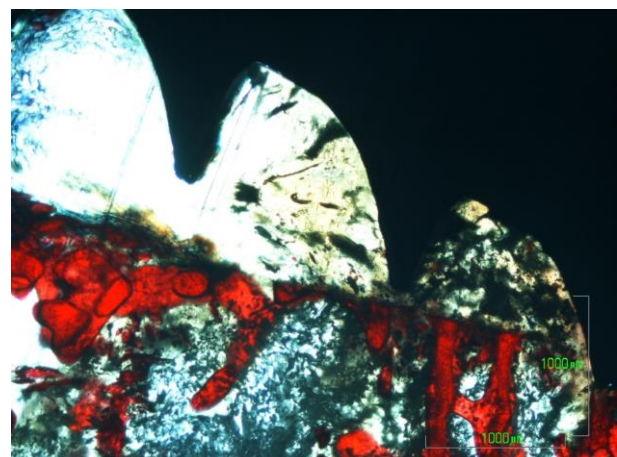
Rx e imagen lupa

Contacto con hueso cortical y trabecular. También con médula adiposa.

Zona izquierda de la imagen se aprecia hueso en contacto con la superficie del tornillo, pero es hueso preexistente, NO regenerado.



(4x) Zona cortical, superior del defecto. Se aprecia el defecto creado. El hueso no ha reaccionado.



(4x) Zona interna del defecto. Encontramos médula adiposa. Contorno del defecto no ha reaccionado el hueso, se ven las trabéculas con un corte recto.

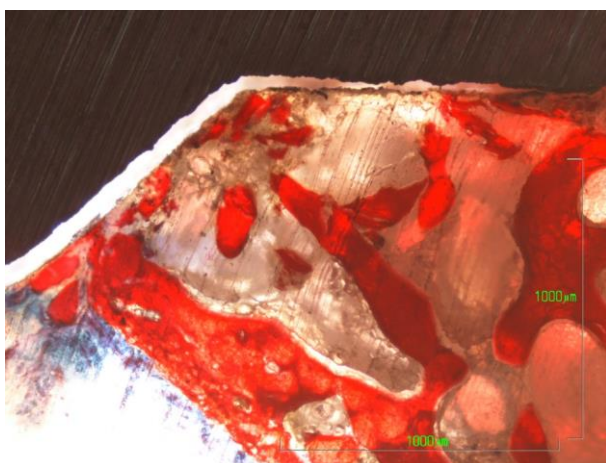
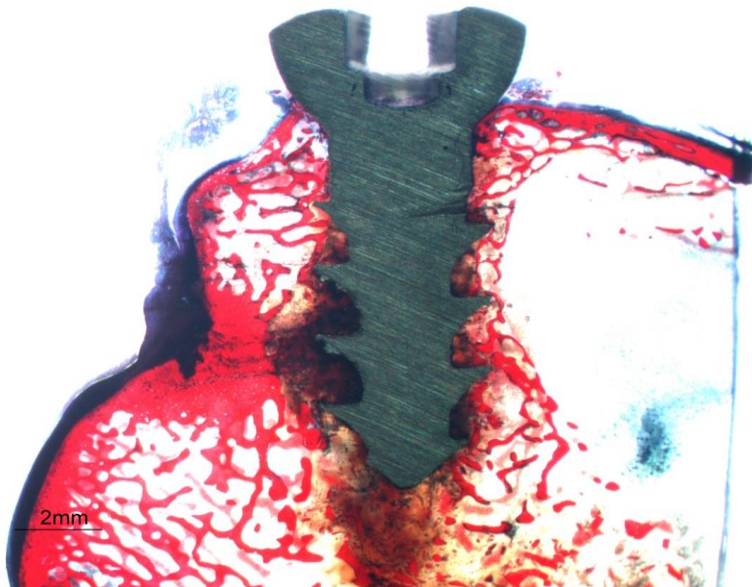
CONTROL 15 (48H)

Rx e imagen lupa.

Tornillo rodeado de hueso cortical y trabecular.

Restos de esquirlas óseas.

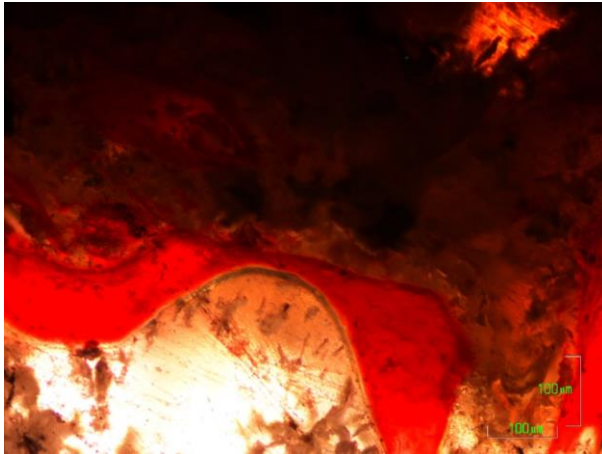
Desarrollo de una estructura fibrilar con células sobre la superficie del tornillo: tejido conectivo.



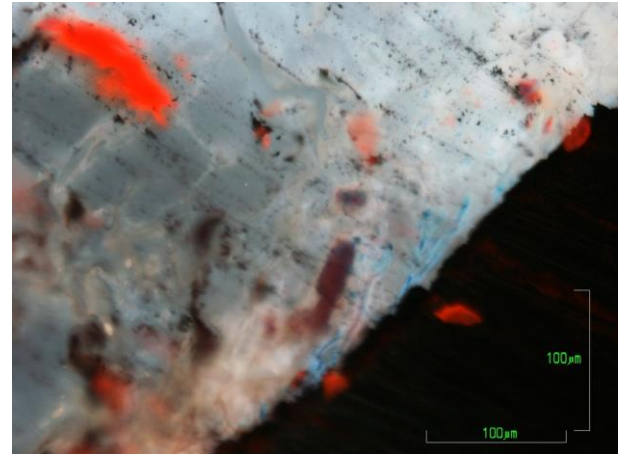
(4x) Zona cortical. Esquirlas de hueso al realizar el defecto. No formación ósea



(4x) Interior del defecto. Se distinguen restos de hueso roto debido a la realización del defecto



(10x) Trabécula seccionada al hacer el defecto, corte recto.



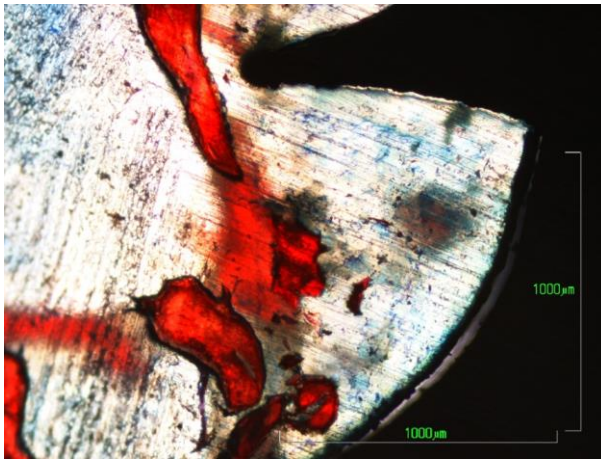
(20x) Detalle fibroblastos sobre superficie del tornillo.

CONTROL 1 (5 d)

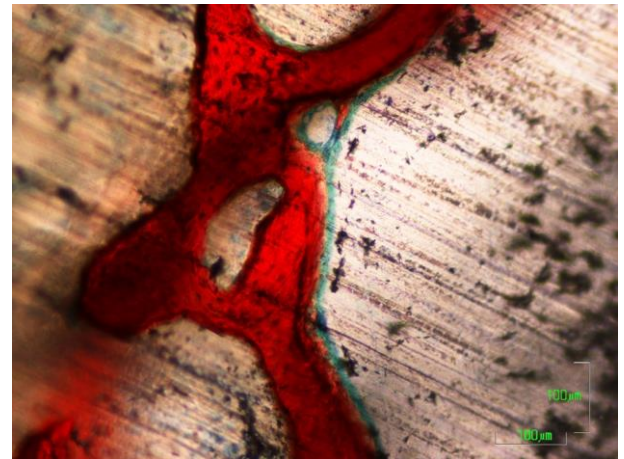
Rx e imagen lupa.

Esquirlas de hueso. Existe tejido conectivo sobre la superficie del tornillo. Encontramos médula adiposa y hematopoyética.

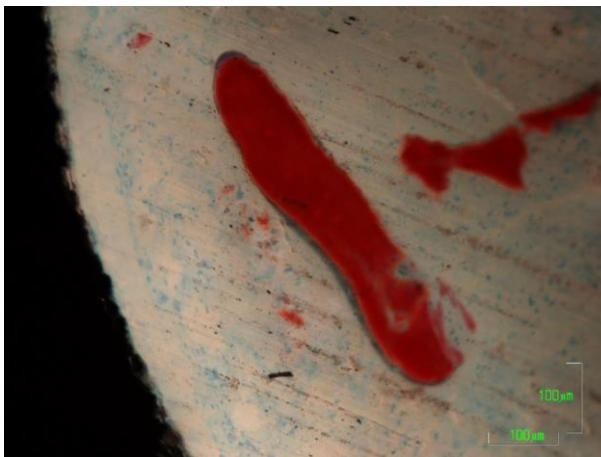




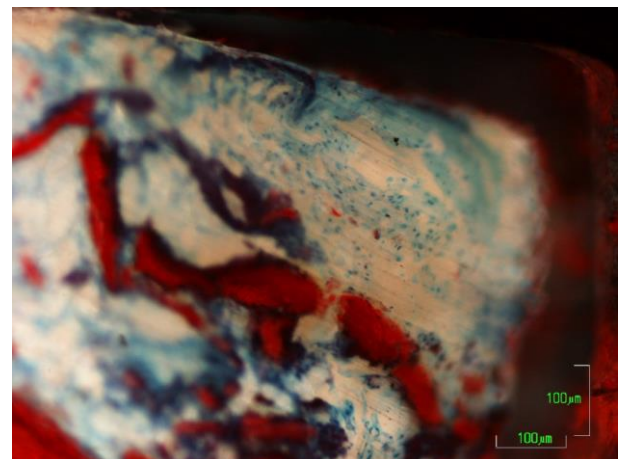
(4x) Superficie del tornillo sin crecimiento óseo. Trabéculas y esquirlas óseas.



(10x) Trabécula ósea con signos de reabsorción.



(10x) Desarrollo de tejido conectivo sobre la superficie del tornillo. Espícula ósea.



(10x) Tejido conectivo sobre superficie del tornillo. Conjunto de esquirlas óseas originadas al hacer el defecto. Corresponde a la zona cortical.

CONTROL 3 (5d)

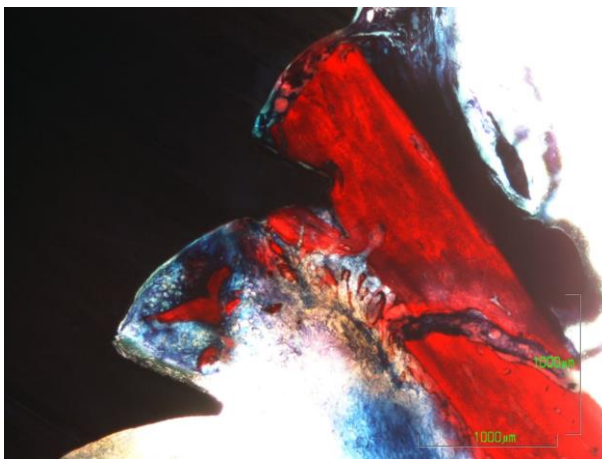
Rx e imagen lupa.

Existe una fractura. Hueso trabecular osteoporótico.

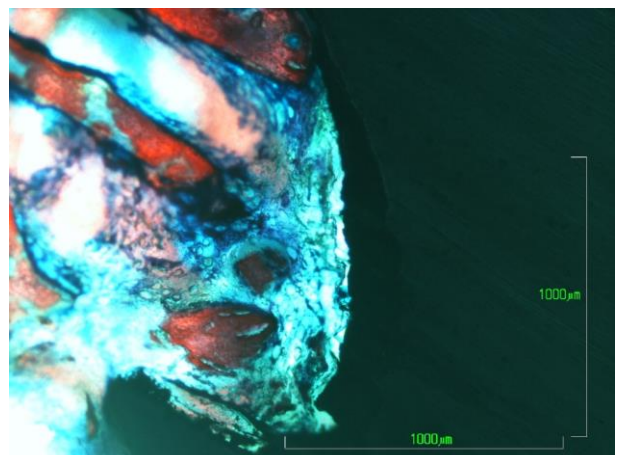
Médula hematopoyética.

Desarrollo de tejido conectivo y adiposo. Desarrollo de tejido conectivo.

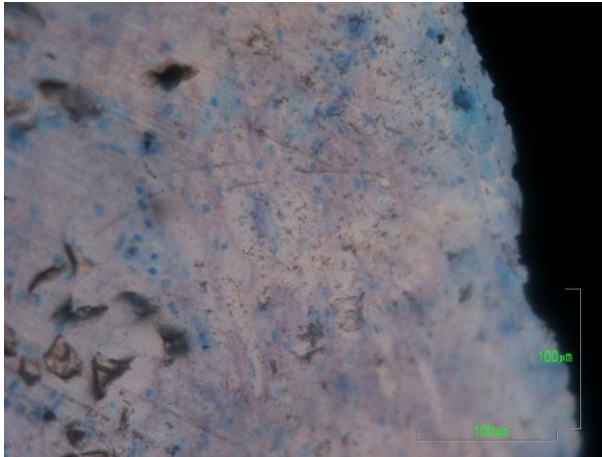
Escasas células de componente inflamatorio, como leucocitos y monocitos.



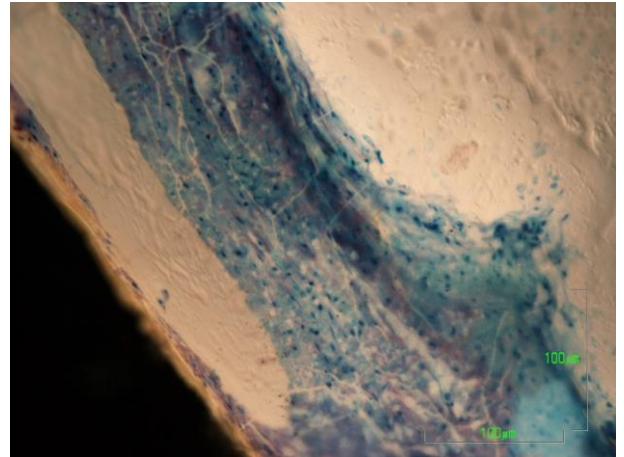
(2x) Zona superficial del defecto, hueso cortical, fractura. No formación ósea sobre tornillo.



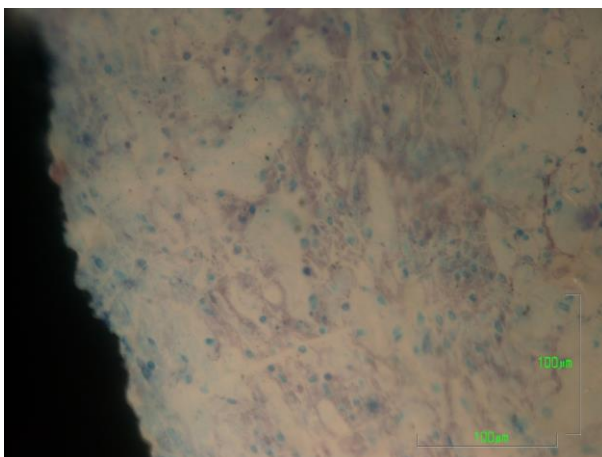
(4x) Superficie del tornillo Esquiras óseas al realizar el defecto.



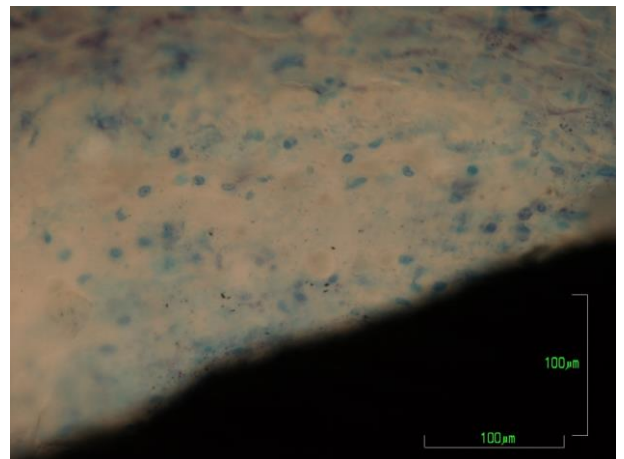
(20x) Detalle de la celularidad del tejido conectivo desarrollado en contacto con la superficie del tornillo.



(20x) Formación de tejido conectivo sobre superficie del tornillo.



(20x) Tejido conectivo sobre superficie del tornillo. Se distingue el componente fibrilar de color morado.



(20x) Tejido conectivo sobre superficie del tornillo. Se distingue escasa celularidad de tipo inflamatorio.

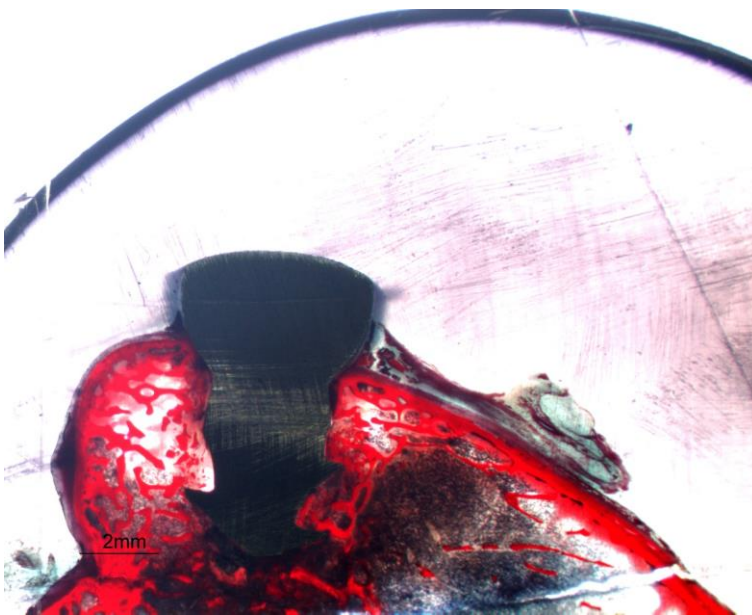
CONTROL 4 (5d).

Rx e imagen lupa

Tornillo implantado en hueso cortical y trabecular.,
en el cóndilo.

Corte no completo del tornillo

Espacio medular hematopoyético



(2X) Médula hematopoyética en zona más interna. No formación ósea sobre superficie del tornillo



(2X) Zona superior, contacto tornillo con hueso cortical. Numerosas esquirlas óseas. MOH

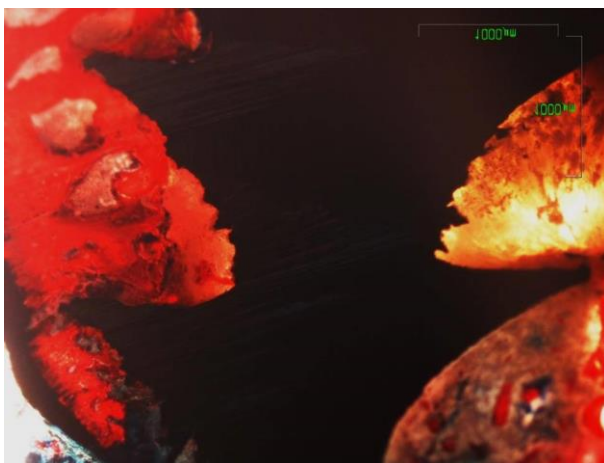
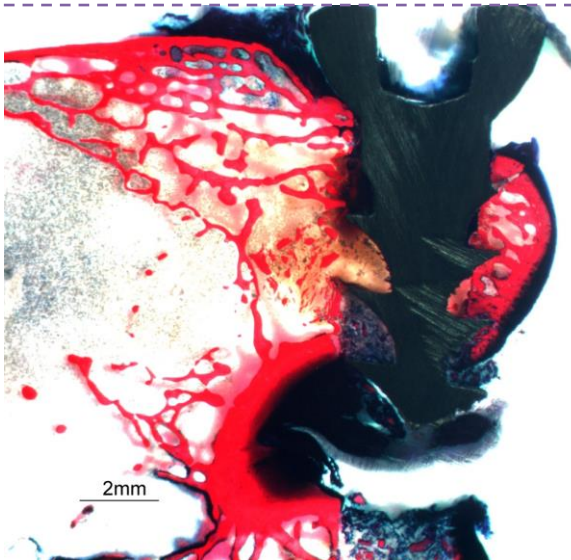
OHAp 7 (24H)

Rx e imagen lupa

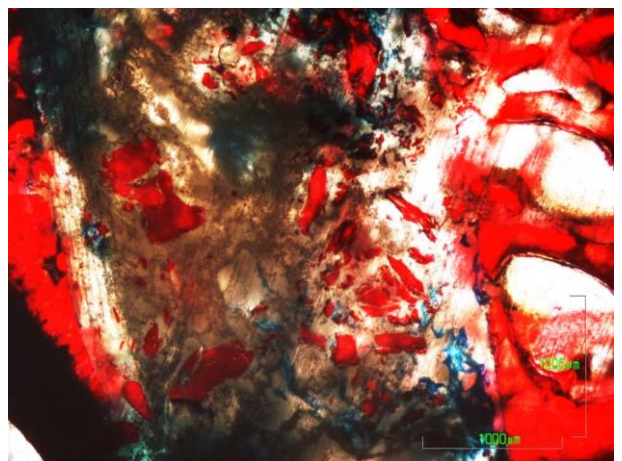
Implantación lateral. Tornillo rodeado de hueso cortical y trabecular. También hay tejido conectivo que penetra desde la cortical. Esquirlas óseas.

Desarrollo de tejido conectivo.

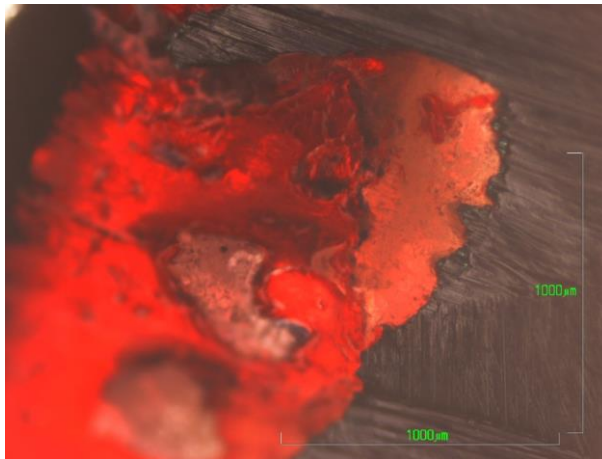
Escaso componente inflamatorio, algún leucocito.



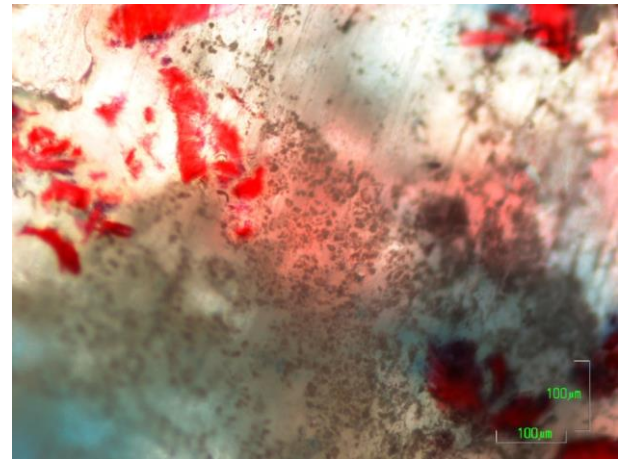
(2x) Zona cortical. No hay formación ósea sobre la superficie del tornillo.



(2x) Zona del defecto vacía, no ha llegado el tornillo. Observamos esquirlas óseas y restos de material.



(4x) Detalle de la superficie del tornillo.



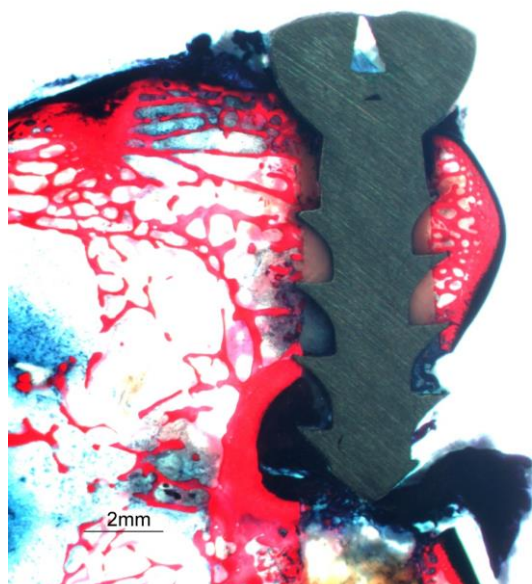
(10x) Defecto no regenerado. Aparecen esquirlas óseas y restos de material.

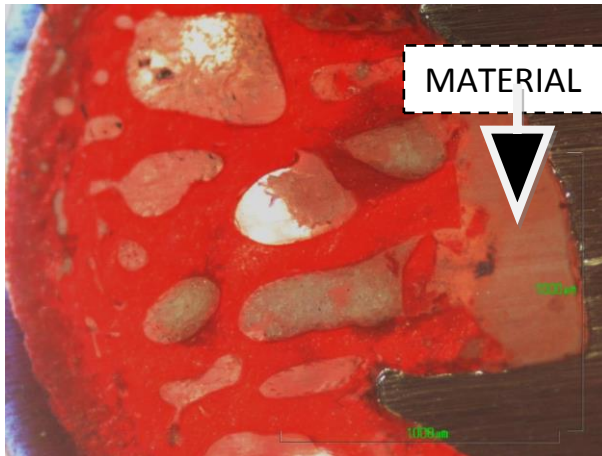
OHAp 8 (48H).

Rx e imagen lupa.

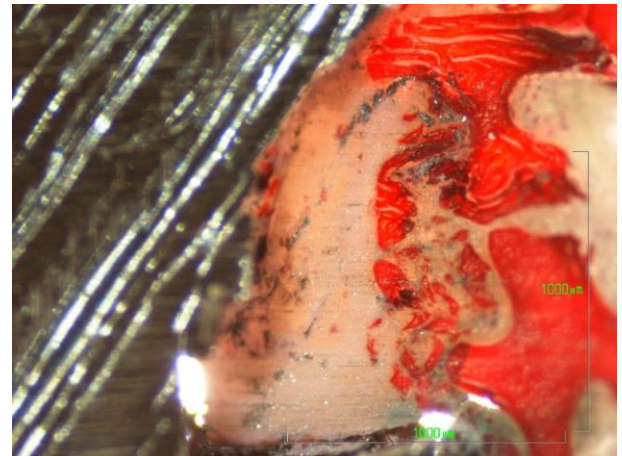
Tornillo colocado en posición lateral, parte del tornillo queda fuera del hueso.

Tornillo rodeado por hueso cortical y trabecular





(4x) En contacto con la superficie del tornillo encontramos el material. No formación ósea.



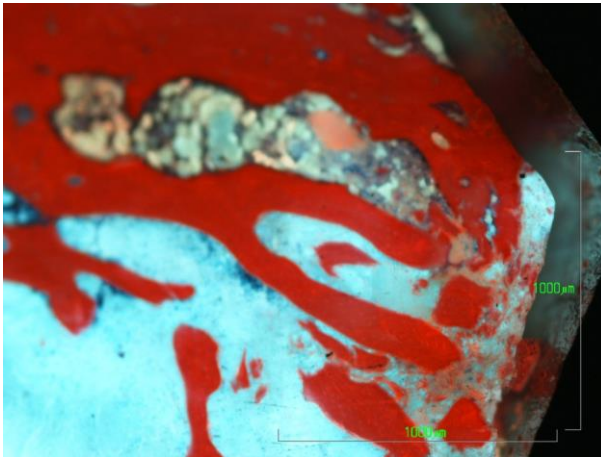
(10x) Superficie del tornillo recubierta por material. Se distinguen esquirlas óseas y las trabéculas óseas sin contacto directo con la superficie del tornillo.

OHAp 9 (48H)

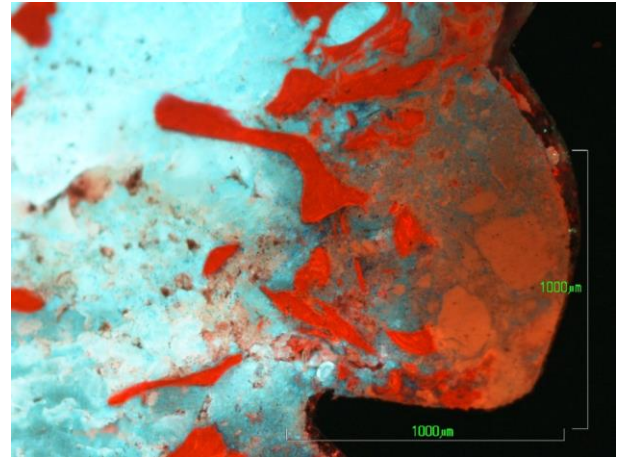
Rx e imagen lupa.

Tornillo implantado en cóndilo, rodeado de hueso trabecular. Alrededor del tornillo el material aparece oscurecido. Encontramos interacción entre el material y las esquirlas óseas. El material se ha dispersado, en contacto con la MOH.

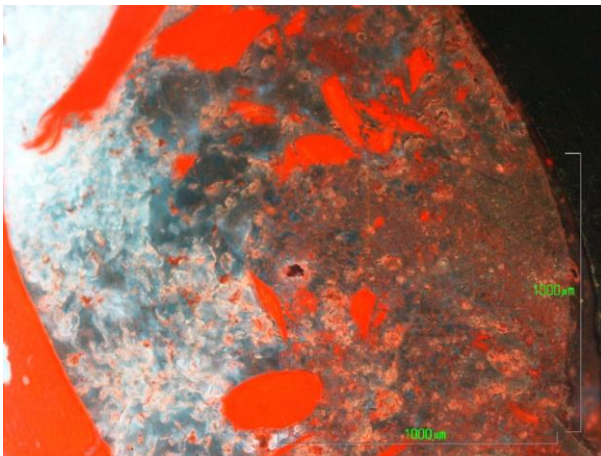




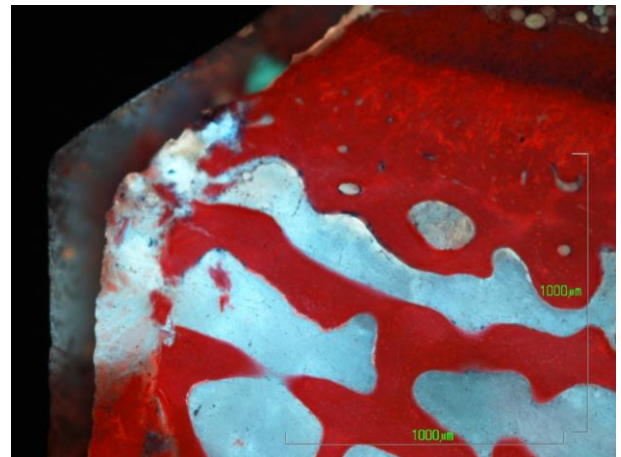
(4x) Zona superficial, escaso contacto con el hueso cortical. Encontramos esquirlas óseas.



(4x) En superficie del tornillo encontramos restos de material. Se ve alguna trabécula ósea previa y en cercanía la MOH.



(4x) Material junto con esquirlas óseas en contacto con la MOH.



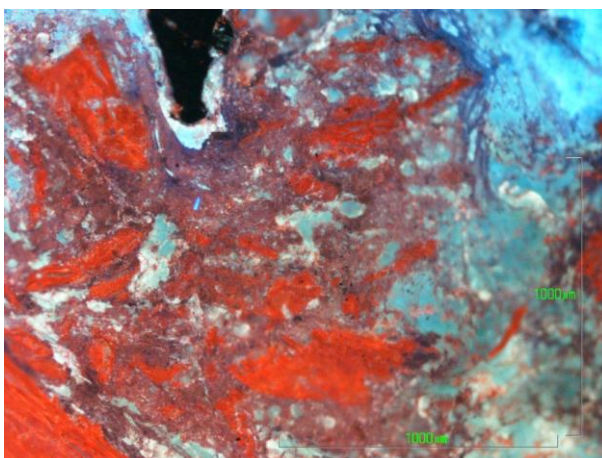
(4x) Zona cortical. Escasas esquirlas óseas. Contacto con el hueso cortical.

OHAp 14 (48H)

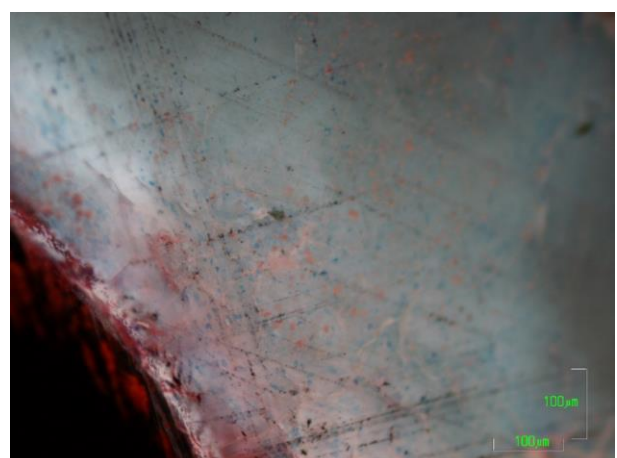
Rx e imagen lupa

Contacto únicamente con hueso cortical no contacto con hueso trabecular.

Encontramos tejido conectivo pero en la zona subcortical, puede proceder del periostio.



(4x) Zona adyacente al tornillo. Esquirlas óseas rodeadas de tejido conectivo y restos de material.



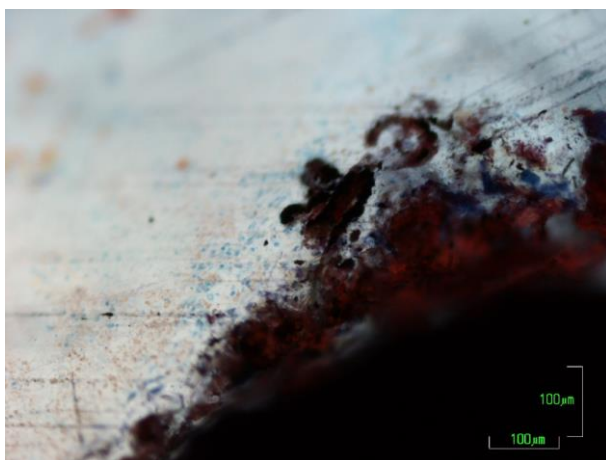
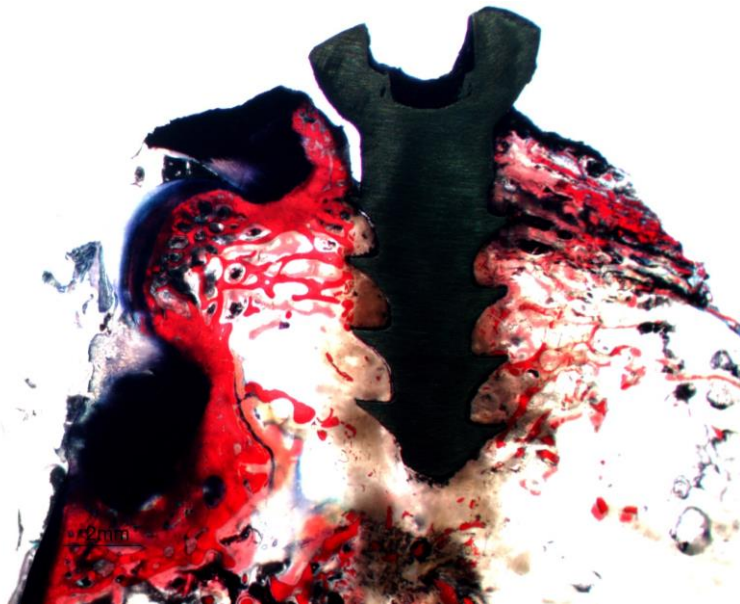
(10x) Zona apical del tornillo, escasa celularidad.

OHAp 15 (48h)

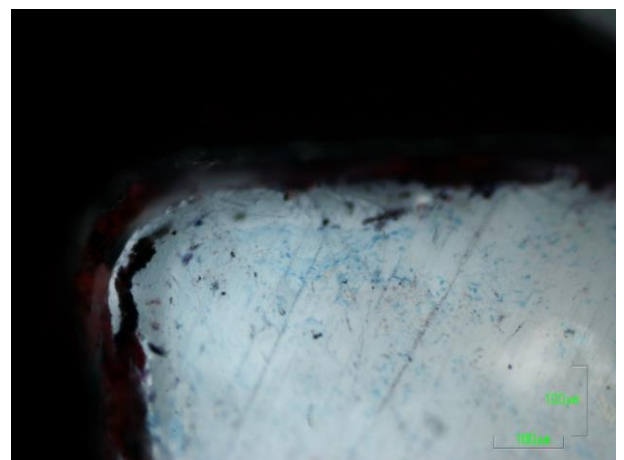
Rx e imagen lupa.

Tornillo colocado de forma oblicua, en cóndilo pero la parte apical queda en la médula.

Encontramos alguna esquirla en interacción con el material y algo de tejido conectivo.



(10x) Zona apical. Encontramos desarrollo de tejido conectivo sobre la superficie del tornillo, restos de material escasos.

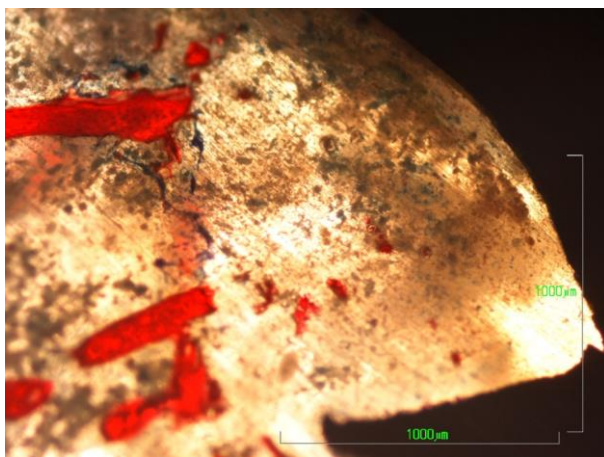


(10x) Zona intermedia del tornillo. Tejido conectivo: se aprecia el componente celular y fibrilar.

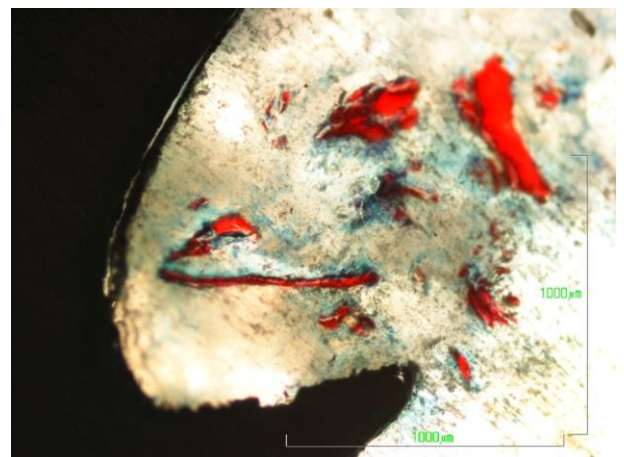
OHAp 17 (5d).

Rx e imagen lupa

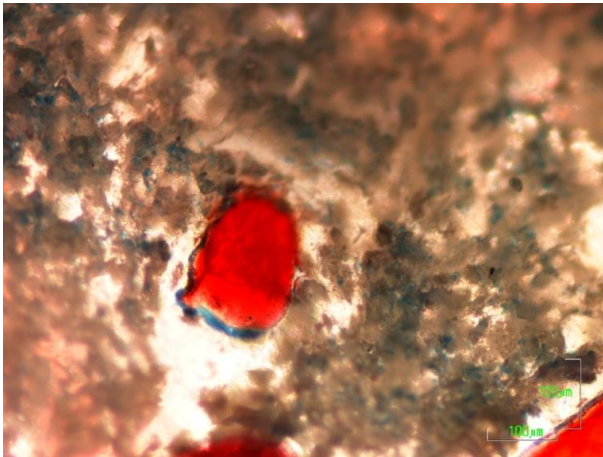
Tornillo colocado en hueso cortical, escaso hueso trabecular. Infiltración del tejido conectivo, con elevado componente celular. No crecimiento óseo sobre superficie del tornillo. Existe un componente celular de tipo inflamatorio y procesos de fagocitosis del material por medio de macrófagos



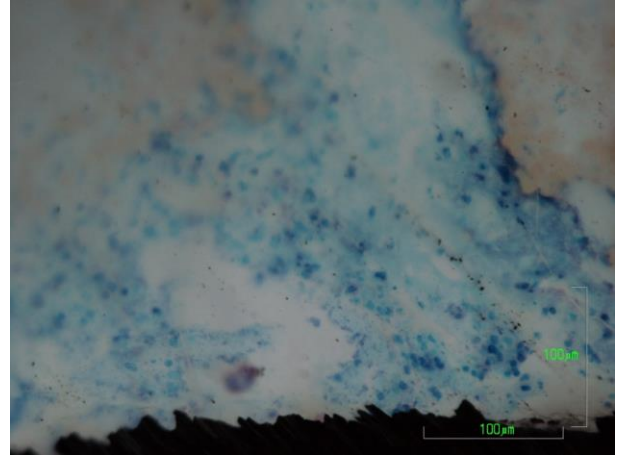
(4x) Se distingue el material que recubre al tornillo.



(4x) Esquirlas óseas aisladas. Superficie del tornillo sin crecimiento óseo.



(10x) Espícula ósea. Se aprecian restos de material y componente celular asociado al material.



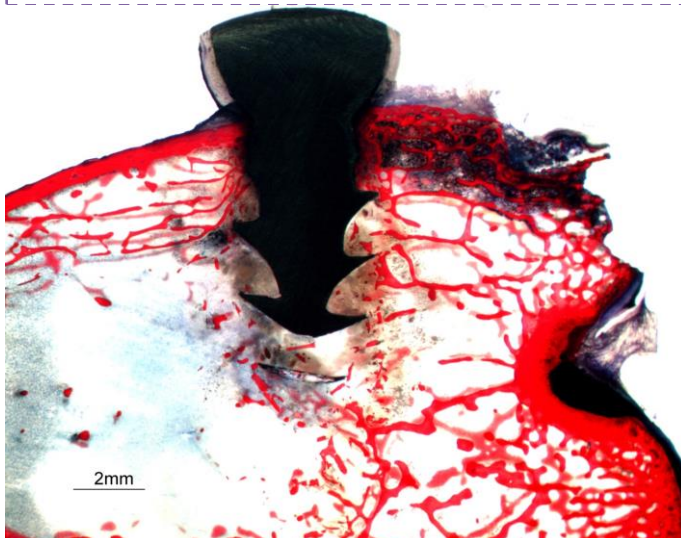
(20x) Componente celular de tipo inflamatorio en el tejido conectivo. Ha penetrado el recubrimiento de material del tornillo.

OHAp 20 (5d)

Rx e imagen lupa

Tornillo en cóndilo, en hueso trabecular y cortical. Contacto directo del material que recubre el tornillo con MOH.

Integración de esquirlas óseas en el material y se distingue algo de celularidad.



OHAp-Fn

OHAp-Fn 25 (24H).

Rx e imagen lupa

Defecto realizado un poco lateral, la parte más interna del tornillo queda fuera, en el espacio intercondíleo.

Tornillo en contacto con hueso cortical y trabecular.

Se distinguen restos de material.

Tejido conectivo poco desarrollado.



2mm



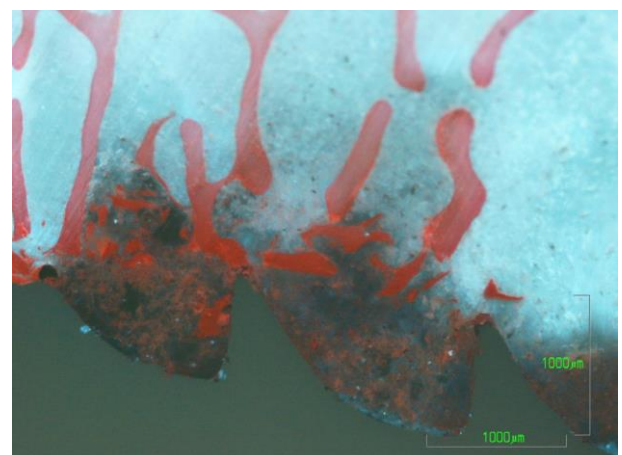
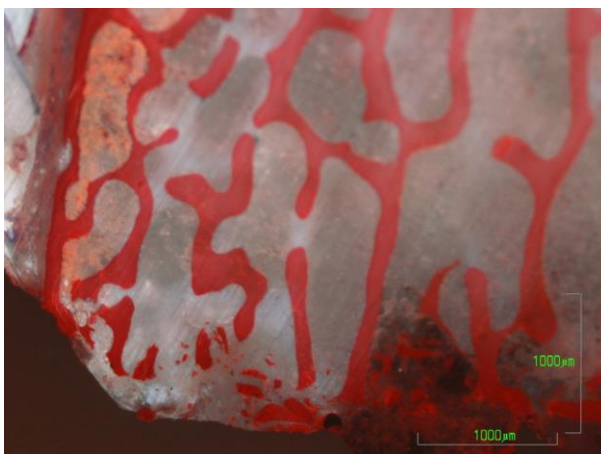
OHAp-Fn 28 (24H).

Rx e imagen lupa

Implantación no exacta en el cóndilo, Más esquirlas en el lado del tornillo que está cercano a hueso trabecular.

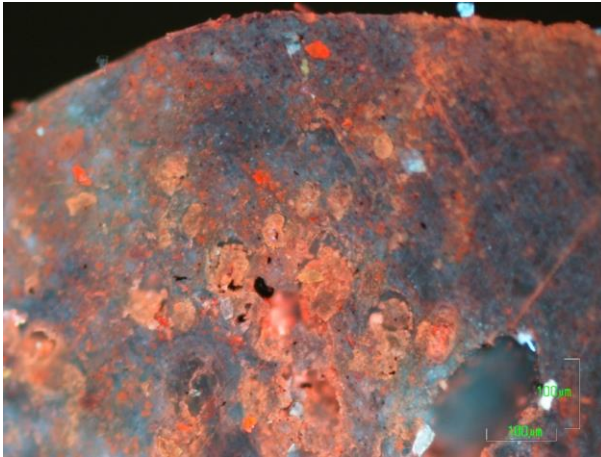
Hay zonas con abundante celularidad..

Restos de material

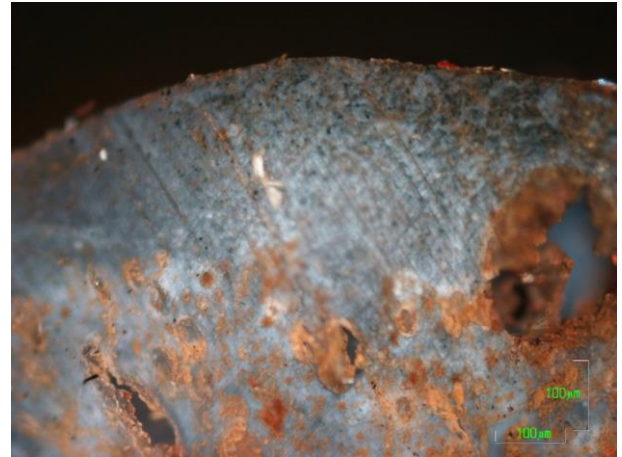


(2X) Panorámica zona superficial.

(2x) Interacción material-esquirlas óseas en superficie del tornillo.



(10x) Detalle superficie del tornillo.
Prácticamente es todo material. Se
aprecian células

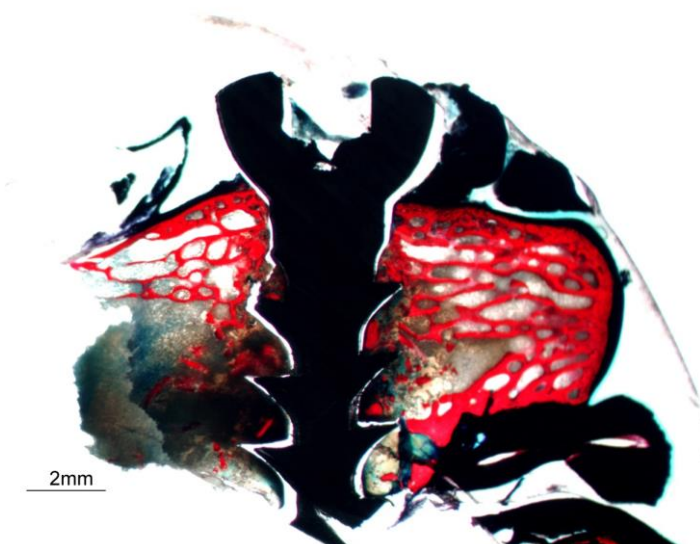


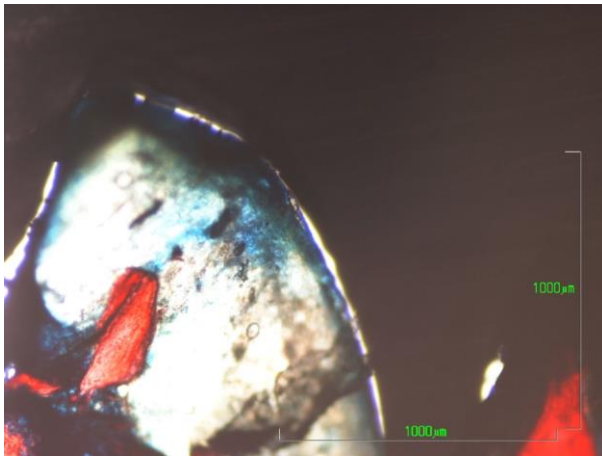
(10x) Superficie del tornillo: mayor
componente celular en asociación con el
material.

OHAp-Fn 31 (48H).

Rx e imagen lupa

Implantación en el cóndilo, rodeado por
hueso cortical y trabecular. Contacto
marcado con el hueso. Se aprecia el
material. Leve componente celular de
tipo inflamatorio.





(4x) No formación ósea sobre superficie del tornillo.

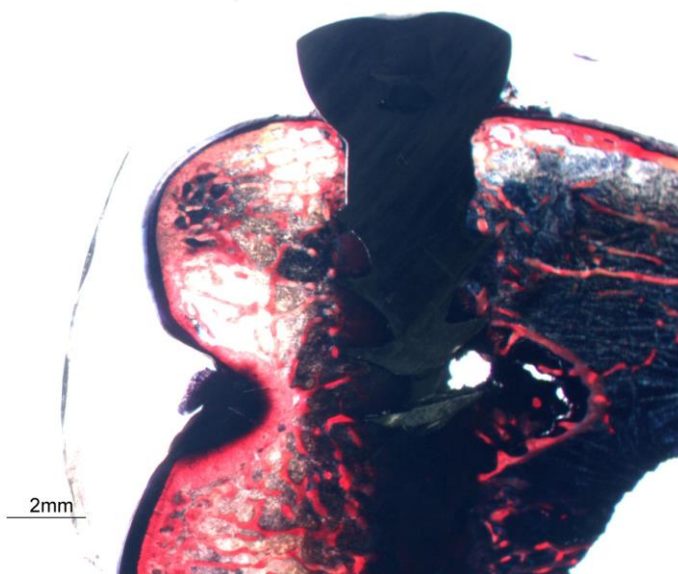


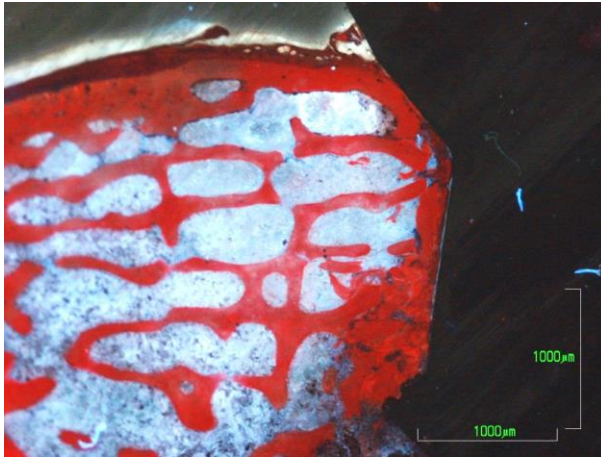
(10x) Restos de material rodeados por tejido conectivo en la superficie del tornillo.

OHAp-Fn 33 (48H).

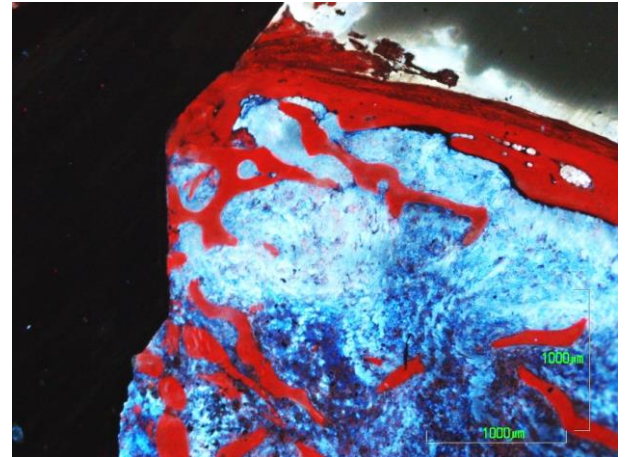
Rx e imagen lupa.

Tornillo implantado en cóndilo, rodeado de hueso cortical y trabecular. Médula con coloración muy marcada, incluso antes de teñir.

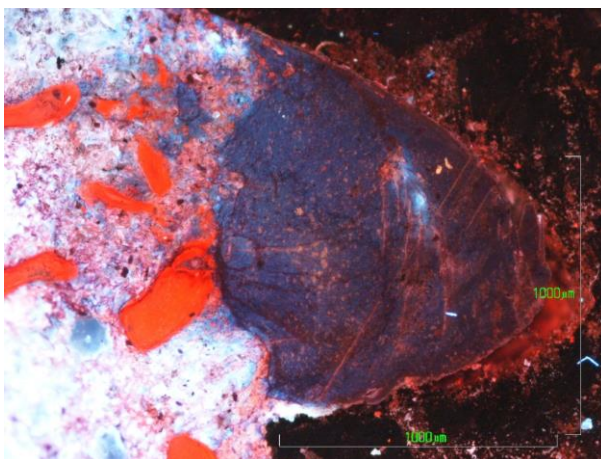




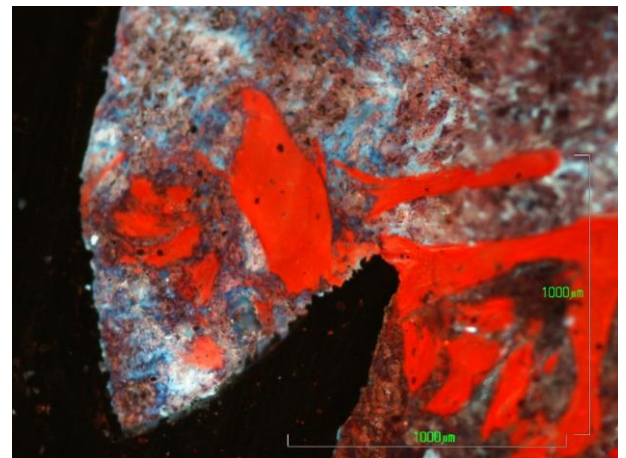
(2x) Zona superficial. Notable contacto hueso preexistente- tornillo.



(2x) El otro lado del tornillo en la zona superficial. Menor contacto óseo.



(4x) Superficie del tornillo rodeada por material. Encontramos esquirlas óseas en contacto con MOH.



(4x) Numerosos restos de material desprendidos en MOH. Esquirlas óseas. Se distinguen también trabéculas óseas.

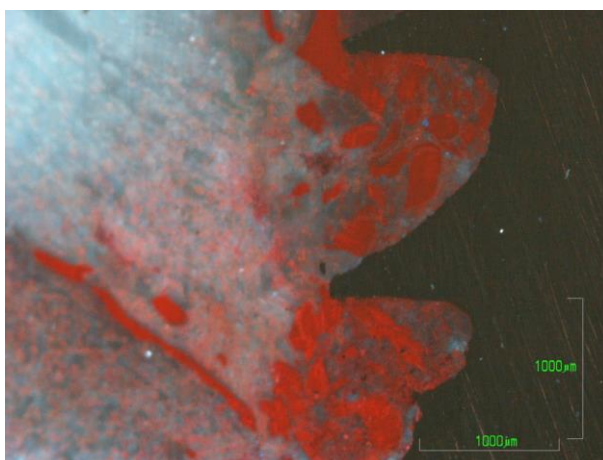
OHAp-Fn 29 (48H).

Rx e imagen lupa.

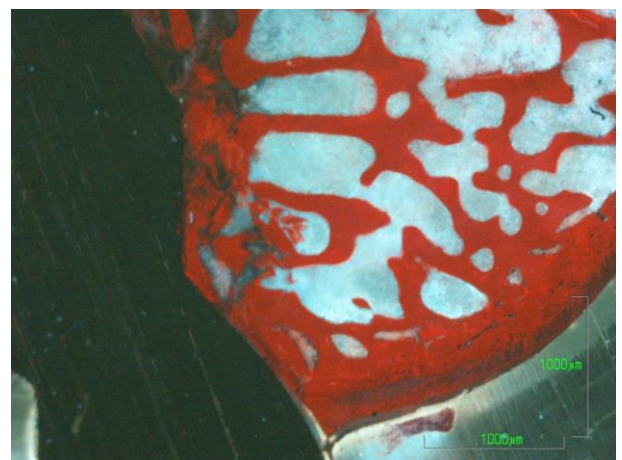
Tornillo implantado en cóndilo. Hay numerosas esquirlas óseas.

Interacción material- esquirlas.

Desarrollo de tejido conectivo en la zona apical del tornillo, donde no hay material.



(2x) Zona superficial. Contacto tornillo-hueso cortical y trabecular



(2x) Numerosas esquirlas óseas en interacción con material

PROTEÍNA 36 (5d).

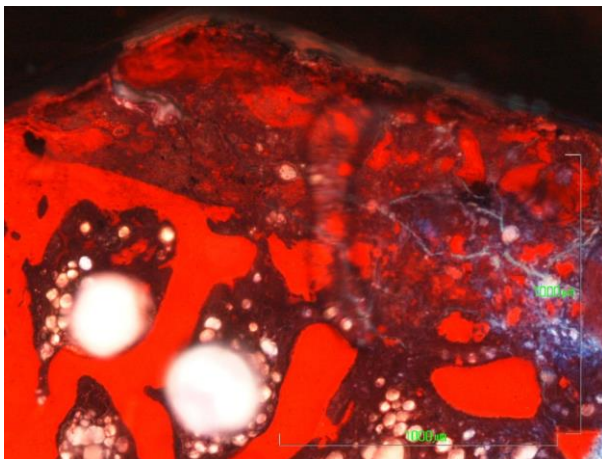
OHAp-Fn 36 (5d)

Rx e imagen lupa

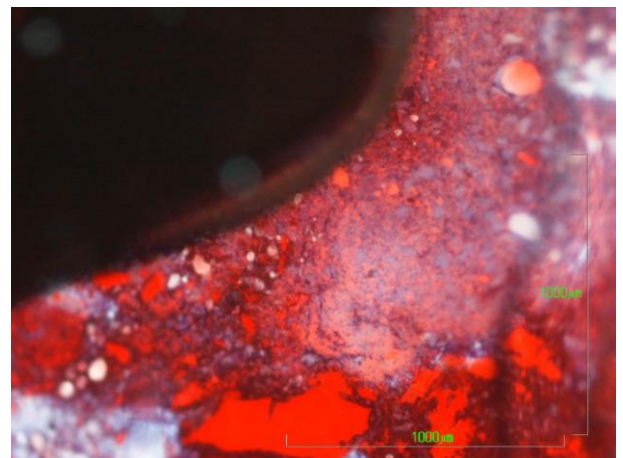
Tornillo en contacto con hueso cortical y escaso hueso trabecular. Relación del tornillo con el hueso cortical y tejido conectivo. Numerosas esquirlas óseas.

Encontramos restos de material.

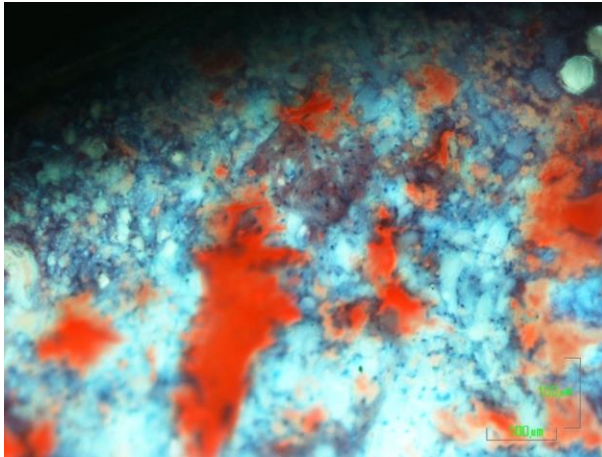
Desarrollo de tejido conectivo.



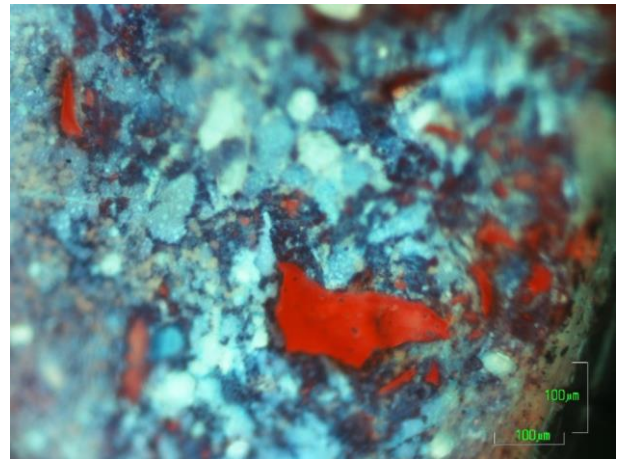
(4x) Zona cortical, numerosas esquirlas óseas, en asociación con tejido conectivo



(4x) Zona interna del tornillo. Restos de material en asociación con tejido conectivo.



(10x) Desarrollo de tejido conectivo rodeando las esquirlas óseas.

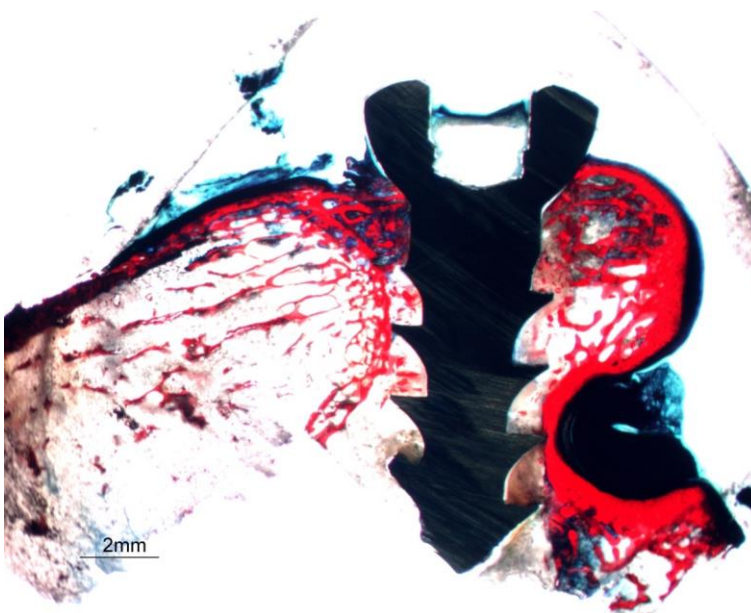


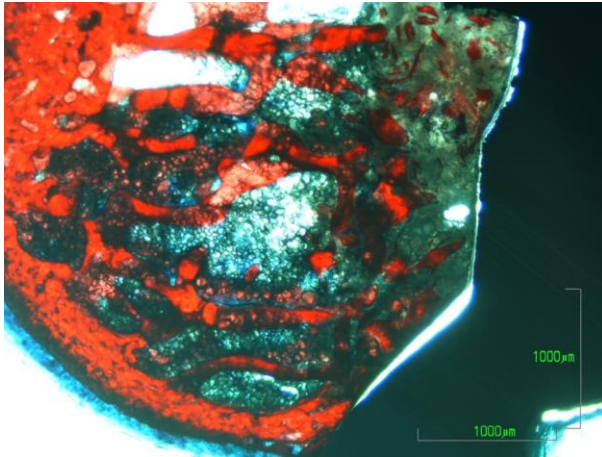
(10x) Restos de material y esquirlas óseas.

OHAp-Fn 42 (5d).

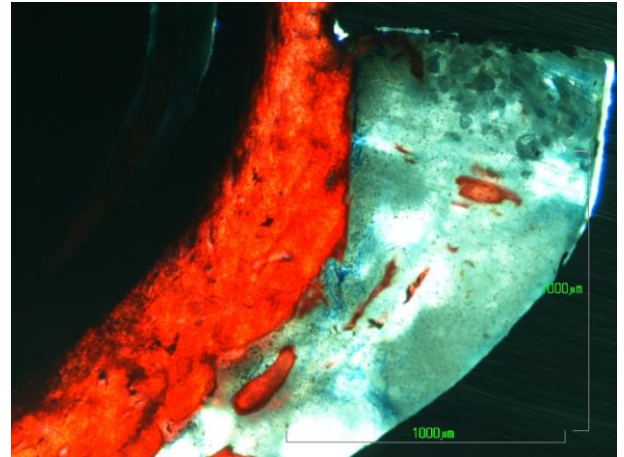
Rx e imagen lupa.

Tornillo implantado en cóndilo, rodeado de hueso cortical y trabecular. En contacto con la superficie del tornillo se ha formado tejido conectivo. Celularidad de tipo inflamatorio. Médula ósea adiposa.

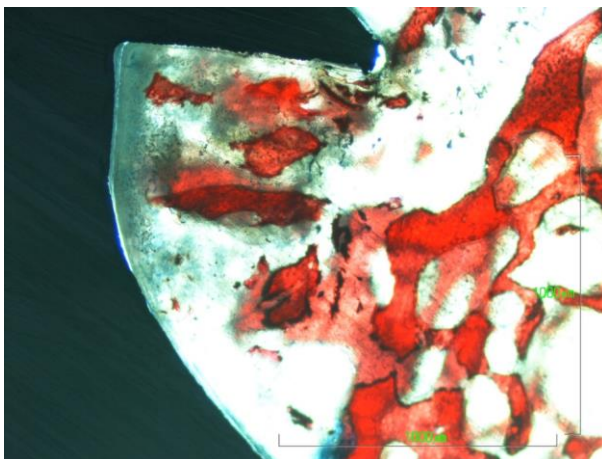




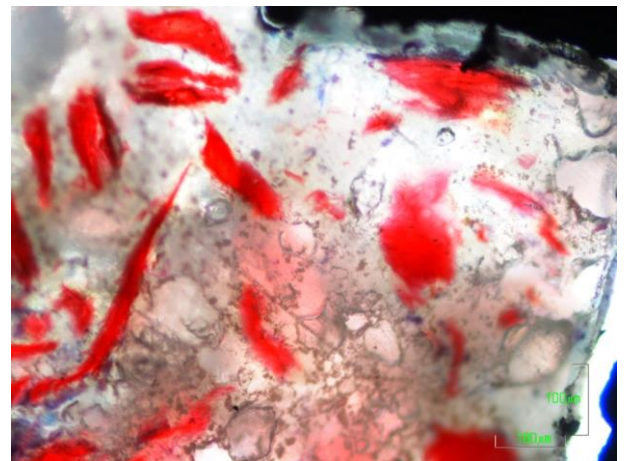
(2x) Zona de implantación cortical. No hay contacto directo con el hueso. Numerosas esquirlas. Médula adiposa.



(4x) Superficie del tornillo recubierta por el material y tejido conectivo, no hay contacto directo con el hueso.



(4x) Se aprecia el hueso trabecular conservado y las esquirlas óseas. No formación ósea sobre superficie del tornillo.



(10x) Esquirlas óseas rodeadas por resto de material.

